



Hinc patriam sustinet

Instituto Superior de Agronomia
Universidade Técnica de Lisboa

**Eficácia de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) e spinosade
no combate a *Helicoverpa armigera* (Hbn) (Lepidoptera:
Noctuidae) em tomateiro**

Sara Sofia Ferreira Pinóia

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Agrónómica

Orientador: Prof. Auxiliar Elisabete Tavares Lacerda de Figueiredo Oliveira

Co-orientador: Prof. Catedrático António Maria Marques Mexia

JÚRI:

PRESIDENTE - Doutor Ernesto José de Melo Pestana de Vasconcelos, Professor
Catedrático do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

VOGAIS- Doutor António Maria Marques Mexia, Professor Catedrático do Instituto
Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

- Doutora Maria José Antão Pais de Almeida Cerejeira, Professora Associada do
Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

- Doutor José Carlos Franco Santos Silva, Professor Auxiliar do Instituto Superior de
Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

- Doutora Elisabete Tavares Lacerda de Figueiredo Oliveira, Professora Auxiliar do
Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Lisboa, 2012

*"Construí amigos, enfrentei derrotas,
venci obstáculos, bati na porta da vida e disse-lhe:*

Não tenho medo de vivê-la!"

Augusto Cury

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, aos meus pais! Vocês são a minha força e em vocês vejo um exemplo a seguir. Ensinarão-me o que é a bondade, a humildade, ensinarão-me sempre a ultrapassar os obstáculos. Ensinarão-me a dar graças à vida e a vive-la!

À minha irmã Ana por ser minha amiga, estar sempre disposta a ajudar-me e ter-me dado a minha alegria com nome de Inês (que me alegrou com o seu sorriso quando estive menos feliz).

Ao Ricardo, que também nunca me deixou desistir e que sempre me apoiou e esteve ao meu lado incondicionalmente.

Aos amigos que tanto se fartaram de ouvir falar das “minhocas” ou das “helicovertebras”, como gostavam de chamar!

À Vera e ao Mário pelo apoio que me deram na fase final deste trabalho.

Ao ISA pelos ensinamentos que me proporcionou ao longo destes anos e aos colegas e companheiros de luta, pelos convívios e alegrias vividas, pelos laços de amizade criados.

À D. Teresa, à Doutora Elsa, Doutora Ana Magro, pela ajuda sempre prestável!

À Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) que, através do projecto estratégico do CEER, financiou este trabalho.

Ao Professor António Mexia por me ajudar num dos momentos mais cruciais deste trabalho e por ter sido um exemplo na minha vida académica.

À Maíte que me acompanhou neste trabalho, ao Instituto de Agrobiotecnologia da Universidade Pública de Navarra (Espanha) e Professor Primitivo Caballero pelo apoio prestado.

Por último, não por ter menos importância mas sim por ser a pessoa que mais influência teve para este trabalho corresponder às expectativas, à Professora Elisabete Figueiredo, por tão bem me ensinar, orientar e por ter paciência comigo ao longo deste trabalho. Sem a professora nada disto teria sido possível.

A todos aqueles que passaram por mim nesta etapa e que de alguma maneira foram uma ajuda, prática ou intelectual; a todos aqueles que me puseram e continuam a levar no caminho do bem.

Obrigada.

RESUMO

Neste trabalho foram realizados ensaios de avaliação da eficácia e persistência de produtos formulados à base de *Bacillus thuringiensis* e spinosade, em cultura de tomate protegido e para o combate de *Helicoverpa armigera*. Estes ensaios foram realizados em dois períodos diferentes: Julho-Agosto e Outubro; a eficácia foi avaliada 10 dias após o tratamento e a actividade residual (persistência) foi avaliada durante 5 dias (1º ensaio) e 7 dias (2º ensaio). Na estufa, nas parcelas experimentais onde foram efectuados tratamentos com spinosade e *B. thuringiensis* obteve-se, respectivamente, reduções da população (de infestação artificial) de 97,7% e 91,7%, e a percentagem de estragos observados foi de 15,8% e 13,7% para spinosade e *B. thuringiensis*, respectivamente. A mortalidade das larvas de *H. armigera*, causada por *B. thuringiensis*, variou entre 41,7% e 58,3% (1º ensaio) e entre 48,9% e 100,0% (2º ensaio) ao longo dos dias de observação, enquanto para spinosade se situou entre 85,7% e 100,0% em ambos os ensaios de persistência. Houve também uma evolução anormal em relação à persistência de *B. thuringiensis* no 2º ensaio uma vez que a mortalidade induzida nestas repetições aumentou ao longo do período de observação. Concluiu-se que spinosade apresentou maior eficácia, quando comparado com *B. thuringiensis*.

Palavras-chave: *Bacillus thuringiensis*, spinosade, eficácia, persistência, lagarta-do-tomate, estragos.

ABSTRACT

In this study, assays were carried out to evaluate the efficacy and the persistence of products based on *Bacillus thuringiensis* and spinosad, in tomato protected crop and for *Helicoverpa armigera* control. These assays were performed at two different periods: July-August and October. Efficacy was evaluated 10 days after treatment and the residual activity (persistence) during 5 days (1st assay) and 7 days (2nd assay).

In greenhouse, a reduction of 97.7% and 91.7% on *H. armigera* population (artificial infestation) and fruit damage rates of 15.8% and 13.7% were observed in the experimental plots treated with spinosad and *B. thuringiensis*, respectively.

The mortality on *H. armigera* larvae caused by *B. thuringiensis* ranged between 41.7% and 58.3% (1st assay) and between 48.9% and 100.0% (2nd assay) along the days observation period, while for spinosad ranged between 85.7% and 100.0% in both persistence assays. There was also an abnormal evolution on the persistence of *B. thuringiensis* in the 2nd assay since the induced mortality in these repetitions increased along the observation period. It was concluded that spinosad presented higher efficiency and persistence, when compared to *B. thuringiensis*.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, spinosad, efficacy, persistence, tomato fruitworm, damages.

EXTENDED ABSTRACT

Helicoverpa armigera is a highly polyphagous pest that attacks mainly tomato and cotton, and other horticultural and ornamental crops all over the world. In Portugal, is one of the most important pests in tomato.

It is extremely important to use insecticides effective against *H. armigera* to control incoming damage that can reach between 0.45% and 5.75% of potential output in the Ribatejo region, the portuguese region where processing tomato production is more important.

Bacillus thuringiensis and spinosad have been widely used, showing high efficacy in control *H. armigera*, and its use is authorized in Integrated Pest Management (IPM).

In this study we performed assays to evaluate efficacy and persistence of Turex and Spintor, products based on *B. thuringiensis* and spinosad, respectively, in a tomato greenhouse crop, comparing the two insecticides against *H. armigera*. For these assays the greenhouse was divided in four blocks, each one with a repetition of each treatment, following the latin square design. Originally, four repetitions were planned to be carried out in each assay period, a total of eight repetitions. However, due to problems occurred in the greenhouse, the persistence assays were performed only with four repetitions (1st assay) and two repetitions (2nd assay), in a total of six repetitions.

To carry out the efficacy assays an infestation with L₂-L_{2PM} larvae of *H. armigera* was made 24 hours before performing the treatments with Turex (*B. thuringiensis* 100g/100 L a.i.) and Spintor (spinosad 20-25 ml/hl a.i.) and water as control. Ten days after spraying the six central plants of each plot were observed, and the mortality of *H. armigera* larvae was assessed. The percentage of fruits attacked by the larvae was also registered as well as the larvae that survived. For the persistence assays tomato leaves were randomly picked up in each plot (about 8 leaflets/treatment/repetition), 24 hours after spraying and each day over a period of seven days. Larvae L₂-L_{2PM} of *H. armigera* was fed with these leaflets for two days in laboratory. Mortality of these larvae was registered throughout five days (1st assay) and seven days (2nd assay), under laboratory conditions.

The results of mortality in both assays were corrected using Abbott's formula. Then they were analysed using mainly non-parametric ANOVA (Kruskal-Wallis test for persistence assays and Friedman test for efficacy assays). The statistical analysis was performed using the SPSS Data Standard (v. 17.0).

In the greenhouse, populations of *H. armigera* (artificial infestation) were reduced 97.7% and 91.7% in plots where treatments with spinosad and *B. thuringiensis* were carried out, respectively. In these plots the percentage of damage observed ranged from 15.8% to 13.7% for spinosad and *B. thuringiensis*.

In the first residual activity (persistence) assay, the average of corrected mortality for spinosad ranged between 85.7% and 100.0%, while for *B. thuringiensis* mortalities varied between 41.7% and 58.3%, significant differences were detected between these two treatments. *B. thuringiensis* presented a

greater decrease in mortality between the 2nd and 5th day (58.3%, 56.3% and finally 41.7%) than spinosad. In the second persistence assay, spinosad presented also higher persistence along the 7 days, causing 100% mortality of the larvae of *H. armigera*, until declining in the 6th day to 85.7%. Unexpectedly and inexplicably there was slightly increase in the spinosad induced mortality in the last day, to 93.8%, and the insecticidal activity of *B. thuringiensis* increased from day 1 to day 5 (66.7% to 100.0%). The lowest value of *B. thuringiensis* induced mortality was observed at day 6 (42.9%), but increased again on day 7 to 68.8%.

Although mortality caused *B. thuringiensis* was 30-45% lower and the persistence was in average lower than spinosad, the two active ingredients showed not different efficacy in greenhouse. However, the percentage of damaged fruit caused by the surviving larvae are statistically different; spinosad caused significant lower damages. Through these results it was concluded that spinosad efficacy was higher for at least 7 days.

ÍNDICE GERAL

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. <i>Helicoverpa armigera</i> (Hbn)	4
2.1. Posição taxonómica e sinonímia.....	4
2.2. Distribuição e importância económica	4
2.3. Biologia e morfologia	6
2.3.1. <u>Ovo</u>	7
2.3.2. <u>Instares larvares</u>	7
2.3.3. <u>Pupa</u>	9
2.3.4. <u>Adulto</u>	10
2.4. Comportamento na cultura do tomate	10
2.5. Factores que condicionam o desenvolvimento de <i>Helicoverpa armigera</i>	11
2.5.1. <u>Factores abióticos</u>	12
2.5.2. <u>Agentes bióticos – luta biológica</u>	12
2.5.3. <u>Luta química</u>	13
3. <i>Bacillus thuringiensis</i> (Berliner)	16
3.1. Características.....	16
3.2. Modo de acção.....	18
3.3. Eficácia e persistência	19
3.4. Resistência	21
3.5. Ecotoxicologia	23
4. SPINOSADE.....	25
4.1. Descrição	25
4.2. Modo de acção.....	26
4.3. Eficácia e persistência	27
4.4. Resistência	29
4.5. Ecotoxicologia	30
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
5.1. Cultura de tomate em estufa.....	32
5.2. Criação em massa de <i>Helicoverpa armigera</i> em laboratório	33
5.3. Execução dos ensaios.....	36
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
6.1. Ensaio de eficácia	43
6.2. Ensaio de persistência	45

7. CONCLUSÃO	49
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

ANEXO I – Substâncias activas autorizadas em Protecção Integrada, para lagartas na cultura do tomate.

ANEXO II – Dieta artificial para alimentação de *Helicoverpa armigera* criada em laboratório.

ANEXO III – Resultados dos ensaios de eficácia e persistência.

ANEXO IV – Resultados da análise estatística relativa aos ensaios de eficácia e persistência.

ANEXO V – Comparações múltiplas de medianas dos ensaios de eficácia e persistência.

Índice de Figuras

	Página
Figura 1 – Distribuição mundial de <i>Helicoverpa armigera</i>	5
Figura 2 – <i>Helicoverpa armigera</i> a. Ovo pré-eclodido; b. Emergência da larva neonata	7
Figura 3 – <i>Helicoverpa armigera</i> a. Larva neonata (L ₁); b. Larva L ₂ ; c. Larva L ₅	9
Figura 4 – Pupa de <i>Helicoverpa armigera</i>	9
Figura 5 – <i>Helicoverpa armigera</i> a. Macho e b. Fêmea	10
Figura 6 – a. Lagarta-do-tomate e estragos provocados por si; b. Perfuração no tomate causado por lagarta-do-tomate	11
Figura 7 – Ciclo de vida de uma célula de <i>Bacillus thuringiensis</i>	16
Figura 8 – Mecanismo de acção de <i>Bacillus thuringiensis</i> em insectos	18
Figura 9 – Modelos do modo de acção das toxinas Cry e resultante mecanismo de resistência	21
Figura 10 – Esquema da constituição das spinosinas A e D	25
Figura 11 – Modo de acção de spinosade	27
Figura 12 – a. Área da estufa já com a plantação efectuada; b. Pormenor das plantas	32
Figura 13 – Cultura de tomate protegido onde se efectuaram os ensaios a. Tutoramento; b. Estado fenológico 4º cacho em floração.....	32
Figura 14 – a. Insectário do ISA; b. Local de criação dos adultos de <i>Helicoverpa armigera</i>	33
Figura 15 – a. Gaiola revestida superiormente com papel vegetal e bebedouros; b. Pormenor dos bebedouros	34
Figura 16 – Placa rectangular com ovos recolhidos e dieta artificial, devidamente acondicionadas para serem colocadas em estufa	35
Figura 17 – a. Lagartas para obtenção da 2ª geração de <i>Helicoverpa armigera</i> ; b. Pupas para 2ª geração	35
Figura 18 – Esquema do delineamento experimental na estufa	37
Figura 19 – Local da deposição das larvas L ₂	38
Figura 20 – Esquema da disposição das larvas em cada subparcela correspondente a cada repetição e modalidade	39
Figura 21 – Laboratório onde se realizaram os ensaios de persistência	39
Figura 22 – Folhas que foram recolhidas aleatoriamente e devidamente separadas em sacos identificados	40
Figura 23 – Ensaio de persistência do dia 6 para a testemunha	40
Figura 24 – a. Placa de plástico quadriculada; b. Placas devidamente seladas, já com dieta e as larvas sobreviventes ao final das primeiras 48 horas	41
Figura 25 – Resultados do Ensaio de Eficácia relativos à mortalidade de <i>Helicoverpa armigera</i> causada por Turex (<i>Bacillus thuringiensis</i>) e Spintor (s.a. spinosade)	43

Figura 26 – Resultados do Ensaio de Eficácia relativos aos estragos causados por <i>Helicoverpa armigera</i> , em parcelas tratadas com água (Testemunha), Turex (<i>Bacillus thuringiensis</i>) e Spintor (s.a. spinosade).....	44
Figura 27 – Resultados do 1º Ensaio de persistência correspondentes à mortalidade corrigida de <i>Helicoverpa armigera</i> induzida por Turex (<i>Bacillus thuringiensis</i>) e Spintor (s.a. spinosade)	45
Figura 28 – Resultados do 2º Ensaio de persistência correspondentes à mortalidade corrigida de <i>Helicoverpa armigera</i> induzida por Turex (<i>Bacillus thuringiensis</i>) e Spintor (s.a. spinosade)	46

Índice de Quadros

	Página
Quadro 1 – Características morfológicas e duração dos instares larvares de <i>Helicoverpa armigera</i>	8
Quadro 2 – Factores abióticos que podem provocar alterações no desenvolvimento de <i>Helicoverpa armigera</i>	12
Quadro 3 – Classificação das subespécies de <i>Bacillus thuringiensis</i> , com maior interesse para a limitação de pragas, em função da posse de diferentes genes codificadores de cristais proteícos	17
Quadro 4 – Calendário de operações relativas aos ensaios de eficácia e persistência	37

1. INTRODUÇÃO

A primeira utilização de pesticidas na agricultura remonta há 4500 anos pelos Sumérios. Dos primeiros pesticidas faziam parte enxofre, mercúrio, arsénico, entre outros compostos inorgânicos (Unsworth, 2010). A “1ª Geração” de pesticidas, até 1940, era composta por substâncias inorgânicas; a “2ª Geração” de pesticidas inclui compostos sintéticos, ou seja, produzidos pelo homem; o seu crescimento acelerou após a Segunda Guerra Mundial com a introdução de novas substâncias baratas, eficazes e de largo espectro. Foi especialmente usado o DDT (diclorifeniltricloetanol), da família química dos organoclorados, o qual era eficaz não só para o controlo de pragas. (Muir, 2007).

Durante mais de 50 anos, o combate de pragas era efectuado unicamente através da Luta Química, sem preocupação na escolha das substâncias activas. Eram utilizados pesticidas indiscriminadamente, sem a preocupação nem ponderação sobre os efeitos secundários que poderiam existir para o Ambiente e para o Homem, nem análise de risco (Amaro, 2003).

A partir de 1960, os investigadores começaram a desenvolver uma abordagem diferente para o controlo de pragas a níveis economicamente aceitáveis, usando estratégias que estimulassem insectos auxiliares, como predadores e parasitóides, que atacam estas pragas e assumindo uma maior gestão de utilização de pesticidas (Unsworth, 2010).

Com a necessidade de implementar uma agricultura mais sustentável surgiram novas modalidades, sendo a produção integrada e o modo de produção biológico as modalidades mais importantes, e com estas novas estratégias de protecção (Amaro, 2003).

Protecção integrada (PI), a modalidade de protecção a adoptar em produção integrada, não é um substituto de pesticidas, mas sim um conjunto de estratégias para melhorar a eficácia ou reduzir a utilização global de pesticidas. No entanto, mesmo com PI, os pesticidas são frequentemente a única maneira de lidar com surtos de pragas (Delaplane, 1996), de forma que não causem prejuízos.

Uma praga exemplo desta necessidade de uso de pesticidas é *Helicoverpa armigera* (Hbn) (Lepidoptera: Noctuidae), designada em Portugal como lagarta-do-tomate. É uma praga-chave não só no nosso país como em quase todo o mundo, à excepção do continente Americano (onde é *Helicoverpa zea* que assume essa importância), pois é altamente polífaga, fértil, adaptável e com grande facilidade de desenvolver resistência aos pesticidas (Araújo, 1990). Em Portugal, esta praga assume um papel importante devido aos prejuízos que causa na cultura do tomate. O tomate é de entre as culturas hortícolas, a que tem maior expressão no comércio nacional, existindo uma fileira estratégica no sector agrícola. As produções destinam-se ao consumo em fresco e à indústria; no entanto, a maioria do tomate cultivado no país destina-se à transformação industrial, que exporta mais de 90% da sua produção de concentrado e respectivos derivados, facturando cerca de 150 milhões de euros por ano (Lascas, 2011). Entre o ano 2000 e 2005 as produções de tomate atingiram um recorde de produção, rondando 1100 mil toneladas, o que equivale a um aumento médio de 23%,

ultrapassando a cota transformadora atribuída a Portugal. Desde 2005 até 2010 as produções variaram ligeiramente, ocupando Portugal o 3º lugar na produção de tomate na União Europeia, a par com a Grécia, com cerca de 1400 mil toneladas, depois de Itália (6400 mil toneladas) e Espanha (4750 mil toneladas) (EUROSTAT, 2011; INE, 2011). No último ano, a Confederação dos Agricultores de Portugal (CAP) estimou prejuízos na ordem dos três mil euros por hectare, e a Federação Nacional das Organizações de Produtores de Frutas e Hortícolas (FNOP) avançou com uma quebra de 18 a 20 milhões de euros, só no que diz respeito ao tomate (Lascas, 2011). Nos últimos dois anos a tendência foi para decréscimo da produção devido às intempéries, acompanhando a tendência geral agrícola; no entanto, Portugal continua sendo um dos maiores produtores da Europa.

Com o desenvolvimento de resistências e a necessidade de se dispor de produtos com maior selectividade, com perfis toxicológicos e ecotoxicológicos mais consentâneos com as exigências actuais e a necessidade de controlar eficazmente pragas-chave de grande importância económica, tal como *H. armigera*, surgiram a partir dos anos 90 novas famílias de pesticidas. (Unsworth, 2010).

Actualmente existem, para o controlo de *H. armigera*, seis substâncias activas autorizadas em Protecção Integrada (DGADR, 2011). *Bacillus thuringiensis* (Berliner) (Eubacteriales: Bacillaceae) e spinosade têm sido referidos como, de entre os mais eficazes, os que apresentam melhor perfil toxicológico e ecotoxicológico. Para além disso, possuem a vantagem de poderem ser utilizados em quer em protecção integrada quer em modo de produção biológico. Na cultura do tomate, os dados disponíveis relativos à actividade destes dois insecticidas são muito escassos, embora existam alguns dados referentes a actividade sobre *H. armigera*.

Assim, e tendo em conta a necessidade do estudo destes insecticidas no binómio *H. armigera* x tomate, os objectivos deste trabalho foram avaliar a eficácia de produtos formulados à base de *B. thuringiensis* e spinosade contra *H. armigera* incluindo avaliação preliminar da sua persistência de acção em cultura de tomate protegido, em condições idênticas à da produção comercial. A experimentação decorreu em duas épocas: Julho-Agosto e Outubro, designados por 1º e 2º ensaios. Nos ensaios designados neste trabalho de “ensaios de eficácia” foi observada a mortalidade induzida por estes insecticidas e avaliados os estragos 10 dias após a sua aplicação. Avaliou-se preliminarmente a actividade residual, designada como “persistência” neste trabalho, observando a mortalidade das larvas após se alimentarem de folhas recolhidas na estufa onde se realizaram os ensaios de eficácia ao longo de 5 ou 7 dias (respectivamente, no 1º e 2º ensaios). Para atingir estes objectivos, foram criadas as condições necessárias realizando o cultivo de tomate em estufa e procedendo à criação de *H. armigera* em laboratório.

Os ensaios foram realizados no âmbito do estágio no ISA da Eng^a. Maíte Arrizubieta Celaya, sob orientação da Prof. Elisabete Figueiredo, com vista ao seu Doutoramento, com o título provisório “Desarrollo de un bioinsecticida basado en el nucleopoliedrovirus simple de *Helicoverpa armigera* para el control de plagas producidas por este insecto”. Este trabalho está a ser desenvolvido no

Laboratório de Bioinsecticidas Microbianos, do Instituto de Agrobiotecnologia da Universidade Pública de Navarra (Espanha) orientado pelo Professor Primitivo Caballero.

Neste trabalho será efectuada uma breve revisão bibliográfica sobre *H. armigera*, *B. thuringiensis* e spinosade (Caps. 2 a 4). No Capítulo 5 são descritos os Materiais e Métodos usados no trabalho e no Cap. 6 são apresentados os resultados obtidos e respectiva discussão. Por último, apresentam-se as conclusões no Capítulo 7.

É de referir ainda que este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), por Fundos Nacionais, através do Projecto Estratégico OE/AGR/UI0245/2011-2012 concedido ao CEER (Centro de Estudos de Engenharia dos Biosistemas).

2. *Helicoverpa armigera* (Hbn)

2.1. Posição taxonómica e sinonímia

Segundo a Fauna Europaea (2011), a posição taxonómica desta espécie é a seguinte:

Reino Animalia

Filo Artropoda

Classe Insecta

Ordem Lepidoptera

Família Noctuidae

Subfamília Heliothinae

Género *Helicoverpa* Hardwick 1965

Espécie *Helicoverpa armigera* (Hbn, 1808)

A sua posição taxonómica tem sido controversa desde a sua primeira classificação até à actualidade (CABI & OEPP/EPPO, 1992). Assim, quando nos referimos a *H. armigera* podemos encontrar variadas sinonímias não só científicas como de nomes comuns, como por exemplo (OEPP, 2008):

- **Sinonímia:** *Chloridea armigera* Hbn, *Chloridea obsoleta* Auctorum, *Heliothis armigera* Hbn, *Heliothis obsoleta* Auctorum.

- **Nomes comuns:** African cotton bollworm, old World bollworm, cotton bollworm, tobacco budworm (EN), noctua del tomate (ES), noctuelle des tomates (FR), elotide del pomodoro (IT), lagarta-do-tomate (PT).

2.2. Distribuição e importância económica

Helicoverpa armigera é uma praga altamente polífaga. Os hospedeiros mais importantes, e em que a lagarta-do-tomate apresenta maior perigo de ataque são, o tomate, algodão, grão-de-bico, sorgo e feijão. Como outros hospedeiros podemos referir a rosa, pelargónio, crisântemo, amendoim, quiabo, ervilha, soja, luzerna e outras leguminosas, tabaco, batata, milho, linho, alguns espécies dos géneros *Prunus* e *Citrus* e outras culturas hortícolas (Lammers & Macleod, 2007).

Helicoverpa armigera está actualmente instalada por toda a Europa, não só em culturas de ar livre, mas também em estufas. É uma praga-chave na Península Ibérica e em países do sul e centro da Europa. Se observarmos o mapa de distribuição de *H. armigera* (Fig. 1) podemos observar que se estabeleceu em regiões de clima tropical (África, Ásia tropical) e climas temperados (Mediterrâneo) (Lammers & Macleod, 2007; OEPP, 2008).

O mercado internacional de hortícolas ornamentais e de outras plantas é um factor que contribui para a disseminação da praga (CABI & OEPP, 1992; Lammers & Macleod, 2007), aliado ao facto desta praga possuir grande capacidade migratória, podendo percorrer, em voo, distâncias superiores a 100 km (revisão de Figueiredo *et al.*, 2006).

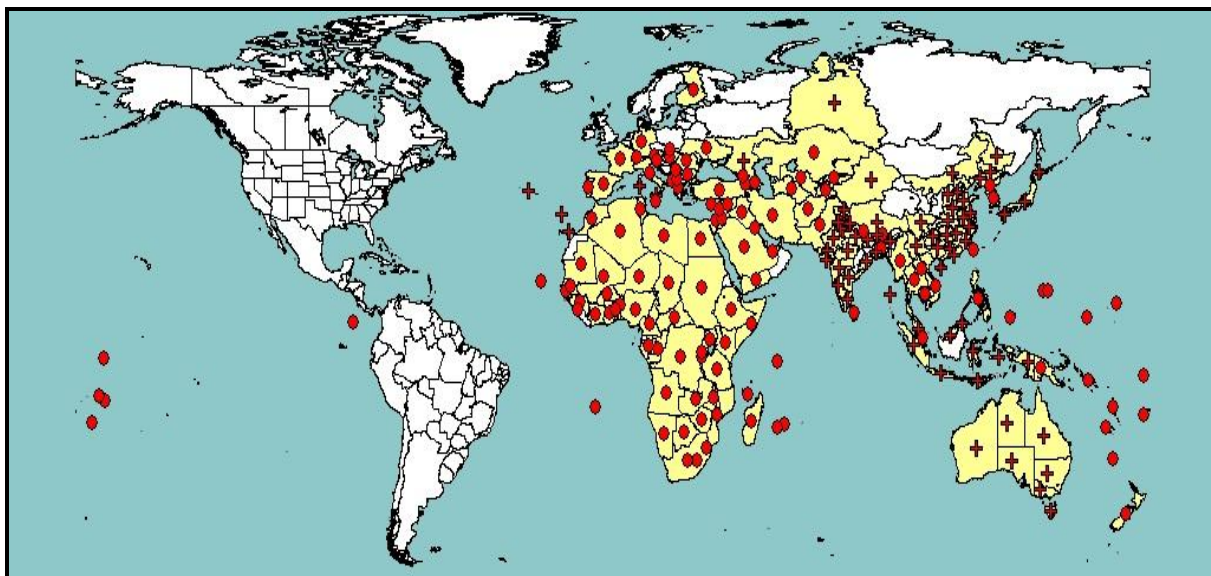


Figura 1 – Distribuição mundial de *Helicoverpa armigera* (OEPP, 2008). *Legenda:* ● - Presente (referência nacional); + Presente (referência regional); ▲ registo pontual.

A importância económica depende de país para país, consoante as culturas de maior importância que são afectadas. Em Portugal, esta praga é muito importante devido aos estragos que provoca na cultura do tomate e prejuízos que acarreta aos agricultores. O tomate de indústria é uma das culturas hortícolas mais importantes e de grande produção nacional, principalmente na região do Ribatejo e Oeste (Figueiredo *et al.*, 2003), embora também haja produção de tomate para consumo em fresco nesta região.

De acordo com Marques (1997), os elevados prejuízos resultam da importante redução quantitativa e/ou qualitativa da produção em resultado directo da acção da praga sobre o órgão comercializado, o fruto. Para além de se alimentar do fruto, *H. armigera* efectua perfurações visíveis nos frutos e alimenta-se de sementes em desenvolvimento (Ferreira, 1989).

O facto de formar galerias no interior do fruto vai dificultar o seu combate e elevar, por isso, o valor dos prejuízos que provoca. Acresce que normalmente cada larva cria galerias em mais de um fruto (1-5 frutos por cacho) (Figueiredo, 2007). Em consequência dos ataques também se dá a entrada de patogénios, o que leva ao apodrecimento precoce do fruto (Marques, 1997).

Araújo (1990) apresentou, resumidamente, os factores que contribuem para a importância económica das populações de *H. armigera*, sendo eles: o facto de ser uma praga altamente polífaga; os adultos possuírem elevada taxa de fertilidade; apresentarem uma elevada capacidade de migração, auxiliada

pelo vento, embora condicionada pelo clima; consumirem os frutos e as sementes, de grande valor comercial e ocorrer a eliminação dos seus inimigos naturais por utilização abusiva de insecticidas.

Os dados sobre os prejuízos existentes em searas de tomate portuguesas são, sobretudo, relativos à produção de tomate de indústria. Estes valores podem variar conforme o tipo de luta utilizada, a quantidade de tratamentos efectuados, diferentes insecticidas aplicados, bem como os diferentes parâmetros de exigência de qualidade de acordo com o objectivo de consumo final (Figueiredo *et al.*, 2006).

Amaro & Mexia (2006) observaram, nas campanhas de 2003 e 2004, na região do Ribatejo, 10 searas de tomate e os respectivos prejuízos causados de acordo com diferentes estratégias de protecção de culturas adoptadas (Luta Química Tradicional e Protecção Integrada). Para a campanha de 2003, os prejuízos variaram entre 1,80% e 5,75% da produção potencial, com valores absolutos entre 1,91 e 5,22 ton/ha; na campanha de 2004, variaram entre 0,45 e 4,79% da produção potencial, com valores absolutos entre 0,55 e 4,94 t/ha. Já em estudos mais antigos, Martins (1990a) detectou ataques que variaram entre 2% (Alvalade Sado) a 40% (Vila Franca de Xira), onde era adoptada a Luta Química Tradicional.

2.3. Biologia e morfologia

Helicoverpa armigera tem actividade predominantemente crepuscular e, por isso, a maioria da sua actividade é realizada durante a noite, permanecendo em repouso durante o dia (Hardwick, 1965; Ferreira, 1989; Araújo, 1990). É fortemente condicionada pela temperatura, humidade do ar e fotoperíodo e, por isso, o número de gerações, conforme o ano e o local, pode variar (Hardwick, 1965; Araújo, 1990; Martins, 1990a).

Em Portugal, ocorrem tipicamente três gerações entre Maio e Outubro, com picos populacionais nos meses de Julho, Agosto e Outubro (Meierrose & Araújo, 1985; Araújo, 1990; Martins, 1990a; Gonçalves *et al.*, 2005). Pode ainda existir uma 4ª geração parcial no sul de Portugal, terminando o voo no início de Novembro (Figueiredo *et al.*, 2006).

Araújo (1990) define como ideal para o desenvolvimento da praga temperaturas de 25°C, sendo o intervalo extremo compreendido entre 15°C e 35°C, humidade relativa de 90% e fotoperíodo de 16 horas.

Em condições adversas de temperatura, seca e geadas pode, durante o estado de pupa, desenvolver diapausa (facultativa) como mecanismo de sobrevivência (Dias, 2005; Martins, 1990b). Em climas temperados como na Península Ibérica, só no Outono e Inverno quando o fotoperíodo e as temperaturas são menores é que as pupas podem sofrer diapausa a qual pode prolongar-se por 8 meses (Ferreira, 1989).

Relativamente ao seu desenvolvimento, *H. armigera* passa por quatro estados de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e adulto.

2.3.1. Ovo

Após a postura, o ovo apresenta um diâmetro de 0,5 mm, forma oval, mais aguda na parte apical e um pouco achatado na base (Cortes, 1972). À postura possui uma cor marfim (Cortes, 1972), desenvolvendo ao 2º dia um aro castanho (Nasreen & Mustafa, 2000) e posteriormente, na sequência do desenvolvimento embrionário, torna-se cada vez mais escuro (Cortes, 1972) (Fig. 2a e 2b).

Os primeiros ovos são normalmente inférteis e após 3 dias esses ovos começam a ficar cada vez mais amarelos (Nasreen & Mustafa, 2000). Num estudo realizado por Nasreen & Mustafa (2000) observou-se que a qualidade da alimentação dos adultos influencia a viabilidade dos ovos. A quantidade de ovos de fêmeas alimentadas com uma solução de 10% açúcar foi maior (795,02 ovos/fêmea) que a de fêmeas alimentadas apenas com água (248,55 ovos/fêmea). As fêmeas sem qualquer tipo de alimentação (sem água e sem açúcar) apenas puseram uma média de 7,37 ovos/fêmea. A viabilidade dos ovos no primeiro caso foi de 75%, seguido de 44% e 0% respectivamente.

Cada fêmea pode pôr entre 200 e 1200 ovos. O tempo que decorre até à primeira postura pode demorar entre 2-4 dias a 25°C ou 5,5 dias a 20°C (revisão de Figueiredo *et al.*, 2006).

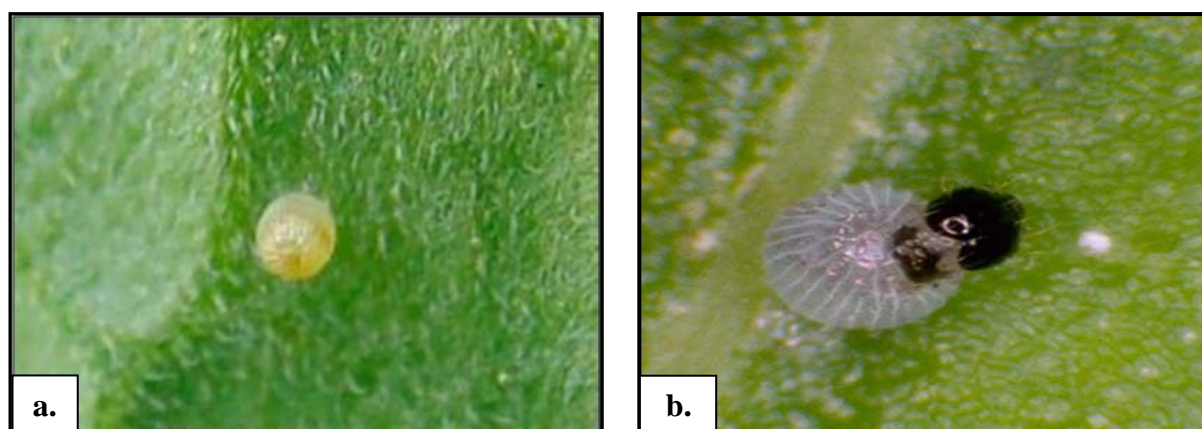


Figura 2 – *Helicoverpa armigera* **a.** Ovo pré-eclodido; **b.** Emergência da larva neonata (Syngenta Crop Protection, s/data).

2.3.2. Instares larvares

A lagarta-do-tomate apresenta 5 a 6 instares larvares, em que o 6º instar pode não existir dependendo de factores como características genéticas, condições e qualidade da alimentação (Araújo, 1990).

No Quadro 1 encontram-se, para cada instar, as dimensões, duração, cores, características e outras observações para cada instar.

Quadro 1 – Características morfológicas e duração dos instares larvares de *Helicoverpa armigera* (Araújo, 1990; Nasreen & Mustafa, 2000; Toguebaye & Couilloud, 1982).

Instar	Dimensão (mm)	Duração (dias)	Cor e características	Observações
L₁ (Fig. 3a)	2,71 ± 0,21 3,40 ± 0,23	2.08 ± 0.09	Linhas longitudinais de cor amarelada. Cabeça, tórax, placa anal e patas castanho-escuro.	Finas sedas de locomoção passiva em caso de alimentação apropriada; Em densidades populacionais elevadas protegem a zona de alimentação.
L₂ (Fig. 3b)	4,97 ± 0,13 4,60 ± 0,34	2.15 ± 0.12	Cápsula cefálica cor castanha escura; Corpo marfim leitoso; Ponto dorsal preto no centro do 3º segmento.	-
L₃	9,85 ± 0,38 9,65 ± 0,74	2.48 ± 0.16	Expressão variável da cor Linhas laterais claras, fundo verde, linha dupla preta lateral-apical e centro-dorsal.	3 pares de patas e 5 pares falsos abdominais (confere locomoção típica).
L₄	18,70 ± 1,70 17,00 ± 0,71	3.13 ± 0.17	Cor variável. Cápsula cefálica creme. Bandas dorsais contíguas e estreitas esbranquiçadas. Lateralmente possui uma larga banda clara.	Larvas agressivamente canibais.
L₅ (Fig. 3c)	20,65±0,18 28,35± 0,69	3.55 ± 0.16	Cor variável.	-

A partir do 3º instar larvar a cor é variável, presumindo-se que seja dependente do tipo de alimento (Araújo, 1990).

As dimensões descritas no Quadro 1, para cada instar, podem no entanto variar, de acordo com a temperatura a que a lagarta está exposta. Em laboratório, Nasreen & Mustafa (2000) determinaram a duração de cada estado e instar de desenvolvimento de *H. armigera* e as dimensões de cada instar larvar, mantendo a criação a 26 ± 1°C, HR = 60-70% e 16 horas de fotoperíodo. Observaram que a necessidade em dias para o desenvolvimento, em cada instar, cresce do 1º ao 6º instar perfazendo este período um total de 15 a 17 dias, contando com a duração do 6º instar à fase de pré-pupa (2,1 ± 0,2

dias). Outros autores indicam que este estado pode durar 18 dias (Figueiredo *et al.*, 2006) a 25°C e, em condições extremas, 41,1 dias a 15°C e 10,9 dias a 35°C (Ferreira, 1989).

No que diz respeito à dimensão, Toguebaye & Couilloud (1982) e Nasreen & Mustafa (2000) diferem um pouco na descrição que apresentam; no entanto, as condições da criação não são referidas por Toguebaye & Couilloud, enquanto os segundos autores realizaram o estudo em condições constantes de temperatura, humidade e fotoperíodo, conforme referido atrás.

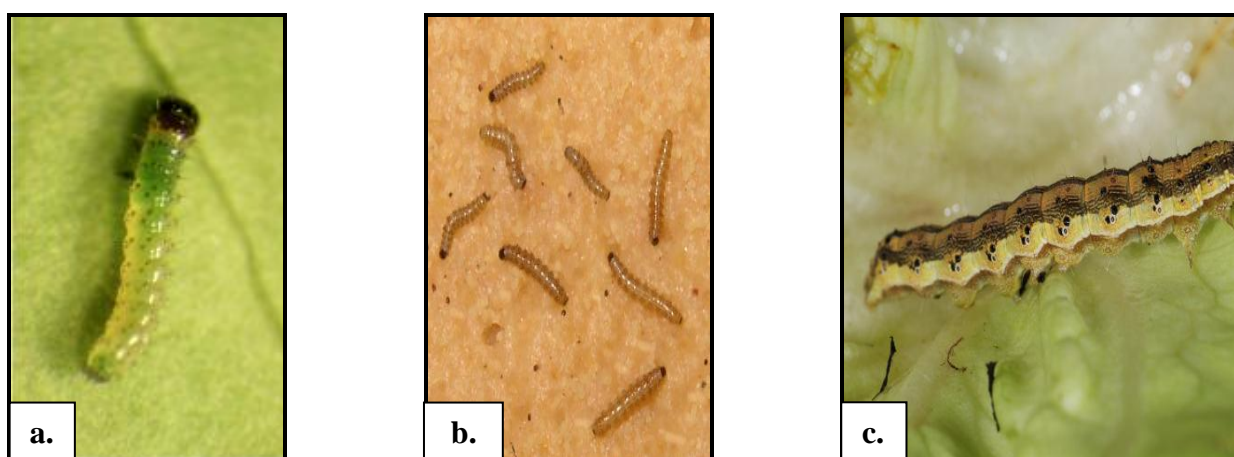


Figura 3 – *Helicoverpa armigera* **a.** Larva neonata (L₁) (Cheng, s/data); **b.** Larva L₂ (Cheng, s/data); **c.** Larva L₅ (Ducept, 2012).

2.3.3. Pupa

No final do último instar larvar, a lagarta na fase de pré-pupa, desloca-se para o solo procurando condições de humidade e temperatura próprias para a sua transformação. Tritura o substrato em que se encontra e com uma “rede” de fios de seda fabrica uma protecção externa, um casulo e transforma-se em pupa. Este estado apresenta-se verde-claro no início, mas o exoesqueleto esclerotiza-se completamente ao fim de 24 horas, apresentando então a pupa uma cor castanha (Fig. 4). É já possível distinguir o sexo através da observação da genitália externa (Araújo, 1990). Tem um formato fusiforme e as dimensões variam entre 12 a 20 mm (Dias, 2005).



Figura 4 - Pupa de *Helicoverpa armigera* (Bayer Crop Science, s/data).

Nasreen & Mustafa (2000) avaliaram a duração deste estado: para o macho a duração do estado de pupa é de $15,4 \pm 0,5$ dias e para a fêmea $13,2 \pm 0,5$ dias, observando-se uma diferença de 2 dias na emergência entre os sexos. Embora sejam estas as durações médias apresentadas para cada estado, estes intervalos podem variar entre 1 a 4 dias, 14 a 17 dias e 12 a 15 dias, respectivamente. Ferreira (1989) mostrou que este período pode variar, em função da temperatura: 48,9 dias a $12,5^{\circ}\text{C}$, 8,2 dias a 15°C e 2,4 dias a 35°C . Figueiredo *et al.* (2006) indica uma duração de 16 dias a 25°C .

2.3.4. Adulto

No estado adulto, observa-se dimorfismo sexual (Fig. 5a e 5b), podendo a fêmea e o macho de *H. armigera* ser distinguidos pela cor e tamanho das asas. Na fêmea, as asas apresentam um tom base castanho rosado e uma envergadura aproximada de 40 mm, enquanto nos machos as asas apresentam uma cor verde acinzentada e cerca de 35 mm de envergadura. Outras diferenças assentam na forma do abdômen, sendo a fêmea mais arredondada (Jayaraj, 1972). Em ambos os sexos, as asas anteriores possuem uma mancha reniforme clara e a margem externa uma linha de sete a oito pontos negros. As asas posteriores são brancas, com uma larga banda distal preta que contém uma mancha branca (Araújo, 1990).

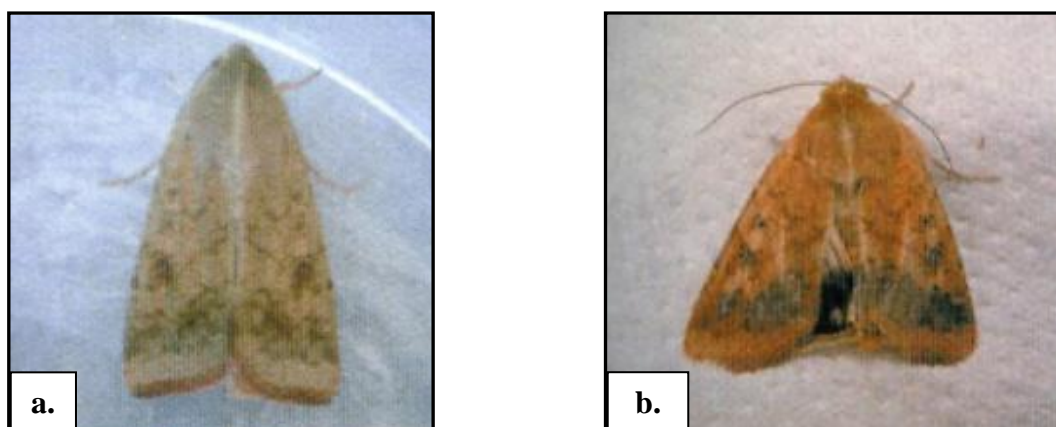


Figura 5 – *Helicoverpa armigera* **a.** Macho e **b.** Fêmea (Dias, 2005).

2.4. Comportamento na cultura do tomate

As fêmeas de *H. armigera* têm tendência a pôr os ovos no terço médio superior das plantas mais viçosas, na proximidade das flores e em folhas mais recentes (Araújo, 1990). Os ovos são postos sobretudo durante a noite, de forma isolada, sobre as plantas hospedeiras (Jayaraj, 1982). Preferencialmente são colocados na página inferior da folha, ao longo da nervura central ou depositados nos botões, inflorescências e flores quando as plantas florescem, permanecendo nestes órgãos até ao 3º instar larvar (Ferreira, 1982; Araújo, 1990; Martins, 1990b). O pico de infestação é frequentemente no máximo de flores abertas (Araújo, 1990).

A larva eclode do ovo, saindo através de um orifício que abre com as suas próprias mandíbulas e, eventualmente, pode alimentar-se de ovos que possam existir nas proximidades. Normalmente encontra-se na parte inferior da página, perto da nervura central, podendo entrar pelo cálice e alimentar-se de frutos em desenvolvimento (Araújo, 1990). Daí até L₃ alimentam-se, sobretudo, de folhas tenras e frutos verdes e inflorescências (Ferreira, 1989; Martins, 1990b). No entanto em L₃ podem também ser observadas frequentemente em pequenos frutos existentes no terço superior da planta, onde fazem perfurações (Araújo, 1990).

Nos últimos instares larvares (L₄-L₆), a larva tem preferência para descer pela planta para frutos maiores, estando na base das plantas, mais protegida. Entram para dentro do fruto através de galerias e alimentam-se de sementes e da placenta do fruto. Nesta fase estão mais abrigadas e em menor contacto com insecticidas e inimigos naturais, sendo difícil de combater (Araújo, 1990). É essencialmente neste período que se observam os maiores prejuízos na qualidade do fruto (Fig. 6a e 7b). A melhor fase para combater esta praga é no período entre L₁ e L₃ visto ainda se alimentarem de folhas e, por isso, estarem mais expostas e susceptíveis aos insecticidas (Figueiredo *et al.*, 2006).

No fim do estado larvar a lagarta mostra tendência para canibalismo. Nesta fase migra para o solo, onde a pré-pupa tritura a terra e se imobiliza para começar a pupar (Araújo, 1990).

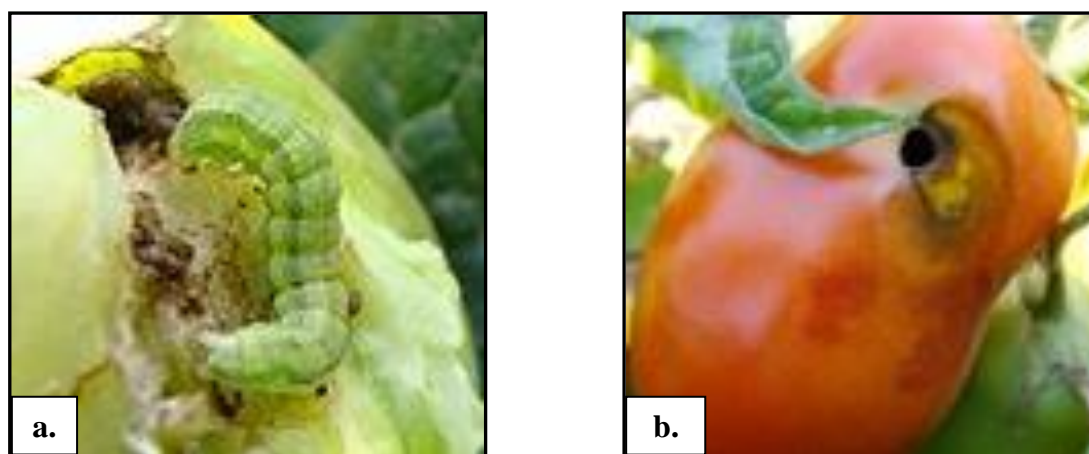


Figura 6 – a. Lagarta-do-tomate e estragos provocados por si; **b.** Perfuração no tomate causado por lagarta-do-tomate (Syngenta Crop Protection, s/data).

2.5. Factores que condicionam o desenvolvimento de *Helicoverpa armigera*

A dimensão da população e, consequentemente, a intensidade de ataque de *H. armigera* é condicionada por factores de nocividade da praga, que podem influenciar favoravelmente ou negativamente o seu desenvolvimento e os estragos que provoca (Amaro, 2003). Estes factores podem ser factores naturais ou ter origem na intervenção humana, e destacam-se, a par de factores abióticos naturais (por ex., climáticos, edáficos), da cultura e das práticas culturais, os auxiliares artrópodes e

entomopatogénios (por proporcionarem a limitação natural de pragas) e a luta química (além de outros meios de luta que o homem recorre para os combater (Amaro, 2003) ou a poluição atmosférica.

Nos próximos subcapítulos 2.5.1 e 2.5.2. serão abordados os factores mais importantes de regulação de *H. armigera* como o clima e os inimigos naturais e, no subcapítulo 2.5.3., meios de luta, respectivamente.

2.5.1. Factores abióticos

Como referido anteriormente, o desenvolvimento desta espécie é fortemente dependente do clima (sobretudo da temperatura e humidade do ar) e do fotoperíodo. As alterações que estes factores podem provocar no desenvolvimento de *H. armigera* e nas suas populações poderão observar-se no Quadro 2.

Quadro 2 – Factores abióticos que podem provocar alterações no desenvolvimento de *Helicoverpa armigera* (adaptado de Araújo (1990) por Marques (1997)).

Factores abióticos	Ovo	L ₁	Pupa
Temperatura	Baixa	Elevado teor de tomatina ou	Alterações mecânicas do
Humidade	higrometria;	rutina nas folhas;	solo;
	Inviabilidade	a Baixa higrometria;	Excesso de humidade;
	temperaturas	Temperaturas muito altas;	Malformação na
	altas;	Plantas em “stress” hídrico	morfogénese do adulto;
		acentuado;	

2.5.2. Agentes bióticos – luta biológica

Alguns inimigos naturais (predadores e parasitóides) de *H. armigera* são bastante eficazes na redução das populações. Meierrose *et al.* (1985), Araújo (1990), Dias (2005) e Gonçalves *et al.* (2005) referem a existência de quatro antagonistas principais de *H. armigera*, sendo dois parasitóides oófagos e dois parasitóides larvares.

Os parasitóides oófagos são, sobretudo, espécies dos géneros *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e *Telenomus* (Hymenoptera: Scelionidae). Actuam dentro dos ovos, fazendo a sua postura no interior, seguindo-se o seu desenvolvimento larvar e pupal. A espécie *Trichogramma evanescens* Westwood pode garantir uma elevada taxa de parasitismo na maior parte do período cultura, tendo maior incidência no período mais quente do Verão, pois está mais adaptada a temperaturas elevadas (Meierrose & Araújo, 1985; Fauna Europaea, 2011).

Os parasitóides do género *Telenomus* são na sua maioria solitários (apenas um individuo emerge por hospedeiro) (Dias, 2005) e, em campos de tomate para indústria portugueses, foi referido como o mais

precoce e coincidente no tempo com a presença dos primeiros ovos de *H. armigera* (Araújo, 1990). No entanto, possui uma maior taxa de parasitismo em Outubro, ou seja, no fim da campanha. O seu efeito pode reduzir a população hibernante (Meierrose *et al.*, 1985).

Comparando os dois parasitóides oófagos, *Trichogramma* ssp. pode atingir taxas médias de parasitismo de 57% e *Telenomus* ssp. taxas de 45%. As taxas de parasitismo tendem a aumentar com o decorrer da campanha, sendo muito baixas no início mas podendo ir até aos 90% no final. (Meierrose & Araújo, 1986; Gonçalves *et al.*, 2005). Estes valores são semelhantes aos indicados por Figueiredo *et al.* (2003), em estudos realizados no Ribatejo, onde verificaram que 36% dos ovos amostrados se encontravam parasitados (53% por *Telenomus* ssp.; 34% por *Trichogramma* ssp.; 13% por parasitóides não identificados). Os parasitóides oófagos têm maior importância como agentes biológicos uma vez que evitam a eclosão da larva. Já os parasitoides larvares, apenas começam a actuar no estado larvar, não impedindo estragos nas folhas ou mesmo nos frutos (Dias, 2005).

Meierrose *et al.* (1985), Araújo (1990), Dias (2005) e Gonçalves *et al.* (2005) apresentam, como parasitoides larvares principais, *Cotesia kasak* (Telenga) (Hymenoptera: Braconidae) (que parasitam nos instares L₂ e L₃) e *Hyposoter didymator* (Thunberg) (Hymenoptera: Ichneumonidae) (que parasita mais frequentemente os instares L₄ e L₅) (Meierrose *et al.*, 1985).

Relativamente a predadores, poucos estudos foram feitos para determinar a sua importância. No entanto, são referidos como predadores: *Chrysoperla carnea* (Stephans) (Neuroptera: Chrysopidae), *Orius laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae), outros artrópodes, mamíferos do solo e aves, afectando vários estados de desenvolvimento (Marques, 1997; Dias, 2005).

No que diz respeito aos agentes entomopatogénicos causadores de doenças em Heliothinae, os mais comuns são: a bactéria *Bacillus thuringiensis*, que actualmente representa 90% do mercado mundial dos bioinsecticidas (Gujar, 2005); e o vírus da poliedrose nuclear de *Helicoverpa armigera* (Figueiredo, 2007; Figueiredo *et al.*, 2009). É também referido, como um potencial entomopatogénio de *H. armigera*, o fungo *Metarhizium anisopliae* (Lawo *et al.*, 2008; Agarwal *et al.*, 2012). Sendo *B. thuringiensis* e spinosade objectos de estudo desta dissertação, a sua revisão bibliográfica pode ser lida nos capítulos 3 e 4, respectivamente.

2.5.3. Luta química

Quando escolhida a luta química como meio de luta, os insecticidas a utilizar tornam-se num factor muito importante, pois a sua escolha e utilização correcta pode promover a diminuição de resíduos no ambiente, diminuindo também os riscos para Homem e outros animais, incluindo os artrópodes auxiliares. Devido à riqueza dos inimigos naturais e à sua importância no controlo de pragas, o conhecimento das características das várias substâncias activas é muito importante.

De acordo com a actualização de Maio realizada pela DGADR (2011), são autorizadas, para Protecção Integrada, as substâncias activas *Bacillus thuringiensis*, clorpirifos, clorantraniliprol, indoxacarbe, lufenurão e spinosade para o combate de lagartas na cultura do tomate (ver Anexo I – Quadro 1).

Destas substâncias autorizadas, clorpirifos é a que apresenta maior toxicidade para outros organismos (auxiliares artrópodes, aves, mamíferos, organismos aquáticos) e uma maior persistência no ambiente, em contraste com *B. thuringiensis* que possui uma meia-vida muito pequena e não é tóxico para os auxiliares. O clorpirifos é geralmente classificado como muito tóxico para aves, organismos aquáticos e pequenos mamíferos herbívoros. Foi identificada para esta substancia activa alto risco a longo prazo para mamíferos (EFSA, 2011a). É moderadamente persistente no solo e na água, pois degrada-se muito lentamente, é praticamente imóvel no solo e na água é pouco solúvel (EPA, 1999). No solo a sua meia-vida pode ir de 11 a 141 dias (25°C, condições aeróbias) e 39 dias (25°C, condições anaeróbias), podendo aumentar este período a temperaturas mais baixas. Na água, a meia-vida pode ir de 16 a 73 dias (degradação abióticas) e 3 a 6 dias (degradação bióticas) (Sanco, 2005a). Relativamente aos efeitos secundários que provoca nos auxiliares é também o que apresenta maior toxicidade, sendo na maioria tóxico a muito tóxico (entre 50 a > 75% de redução da população) (Biobest, s/data; Koppert, s/data; ver Anexo I – Quadro 2), incluindo abelhas (EPA, 1999; Sanco, 2005a).

O indoxacarbe é moderadamente tóxico a muito tóxico para aves e organismos aquáticos e muito tóxico para os polinizadores (Sanco, 2005b). Para os auxiliares, segundo os dados disponíveis (Biobest, s/data; Koppert, s/data; ver Anexo I - Quadro 2), é tóxico (50-75% de redução da população) para *Orius laevigatus* e *Amblyseius swirskii* (Athias-Henriot) (Acari: Phytoseiidae), e muito tóxico (>75% de redução da população) para *Aphidius colemani* (Viereck) (Hymenoptera: Braconidae). No solo é persistente e na água menos: no solo tem meia-vida entre 3-121 dias (20°C, condições aeróbias) e 151 dias (20°C, condições anaeróbias); na água é estável a pH 5, sendo a sua degradação favorecida com pH alcalino (22 dias a pH 7; 0,3 dias a pH 9) e em condições bióticas (meia-vida de 1 a 3 dias) (Sanco, 2005b).

O lufenurão apresenta baixa toxicidade para aves, mamíferos, peixes, possuindo potencial de biomagnificação e bioacumulação (EFSA, 2008). É muito tóxico para aquáticos invertebrados e pouco tóxico para abelhas (FAO, 2007). Pode causar irritação na pele quando em contacto e exposto prolongadamente (EFSA, 2008). Relativamente a outros organismos não-alvo apresenta baixo risco (EFSA; 2008); no entanto, para alguns artrópodes auxiliares apresenta-se como muito tóxico, como por exemplo para *C. carnea*, *Macrolophus caliginosus* (Wagner) (Hemiptera: Miridae), *Opius* ssp. (Hymenoptera: Braconidae), e coleópteros (Biobest, s/data; Koppert, s/data) (ver Anexo I - Quadro 2). Devido à sua metabolização lenta é muito persistente no solo e nas águas subterrâneas tem uma persistência moderada a elevada (EFSA, 2008). Degrada-se mais rapidamente em meios alcalinos (21,3 dias a pH 9 e 30 dias a pH 5) (FAO, 2007).

No que diz respeito ao perfil ecotoxicológico de clorantraniliprol, esta substância activa tem baixo impacto nos organismos não-alvo (aves, mamíferos, minhocas, microrganismos, algas e outras plantas, assim como em muitos artrópodes auxiliares), embora para organismos aquáticos apresente elevada toxicidade (EPA, 2008). No que diz respeito aos artrópodes auxiliares apresenta baixa toxicidade (0-30% de mortalidade) para alguns predadores como, por exemplo, *C. carnea*, *O. laevigatus*, *Orius insidiosus* (Say) (Hemiptera: Anthocoridae), alguns parasitóides do género *Trichogramma* e polinizadores como *Apis mellifera* (L.) (Hymenoptera: Apidae) (DupondTM, 2007). O clorantraniliprol pode ser caracterizado como persistente e móvel em ambiente terrestre e aquático, esperando-se que acumule resíduos no solo de ano para ano. A sua retenção no solo, a baixa solubilidade na água e a sua não volatilização indicam um baixo potencial de movimento nas águas superficiais e subterrâneas. A sua degradação no ambiente é favorecida com as altas temperaturas, meios alcalinos e luz UV (EPA, 2008). Informações mais detalhadas sobre clorantraniliprol ainda não foram disponibilizadas pela UE (EFSA, 2011b), esperando que tal seja possível em 2014 (Sanco, 2008a).

Podem ser consultadas informações sobre a classificação toxicológica e frases de risco, dos produtos formulados à base destas substâncias activas, no Quadro 1 do Anexo I deste trabalho. Dados de ecotoxicologia referentes a *B. thuringiensis* e spinosade serão igualmente apresentados nos Cap. 3 e Cap. 4, respectivamente.

3. *Bacillus thuringiensis* (Berliner)

3.1. Características

Bacillus thuringiensis, ou Bt como é comum designar, foi descrito pela primeira vez em 1915, por Berliner (revisão de Marques, 1997).

É uma bactéria Gram-positiva, aeróbica, com forma de bastonete, que forma esporos sem deformação do esporângio (revisão de Figueiredo, 1997), com propriedades entomopatogénicas (Bravo *et al.*, 2007). O solo tem sido descrito como o seu principal habitat (Schnepf *et al.*, 1998), no entanto, também tem sido encontrado em ambientes aquáticos, cadáveres de insectos, plantas e detritos, etc. (revisão de Garcia, 2009).

Devido às suas características foram desenvolvidos insecticidas a partir desta bactéria, para o combate de diversas pragas, fazendo parte do grupo dos bioinsecticidas.

A importância crescente de *B. thuringiensis* como bioinsecticida levou a que nas últimas décadas tenham sido reforçadas as investigações por todo o mundo, tornando-se no grupo dominante (90%) do mercado de bioinsecticidas (Gujar, 2005).

A bactéria *B. thuringiensis* reproduz-se através de sucessivas divisões celulares e apresenta-se no final da esporulação como um esporângio (célula-mãe) composto por um esporo e um cristal proteico. A célula-mãe é lisada, libertando-se o esporo e o cristal proteico (revisão de Frescata, 2004) (Fig. 7).

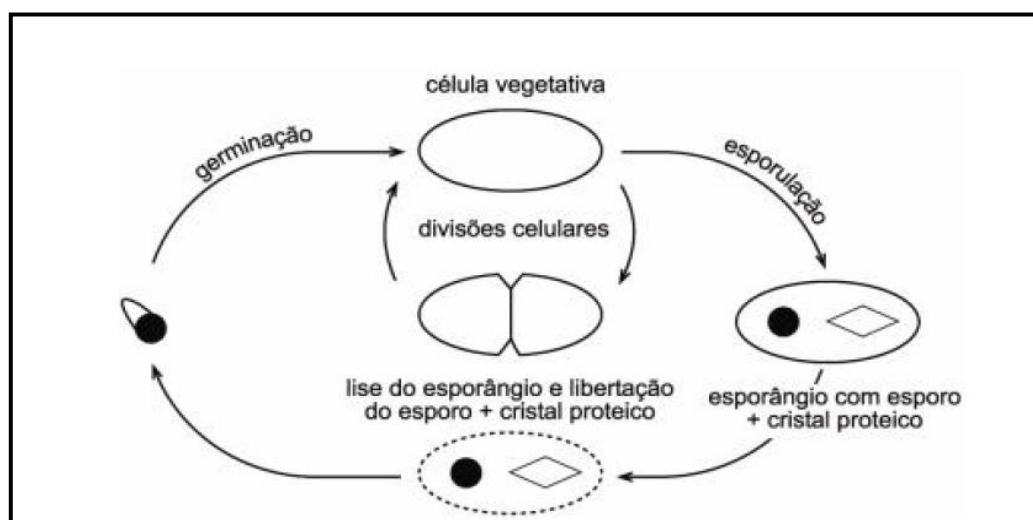


Figura 7 - Ciclo de vida de uma célula de *Bacillus thuringiensis* (Ciba, 1993).

Os cristais podem conter uma ou mais proteínas insecticidas, denominadas Cry, as quais são codificadas por genes também denominados *cry*. Estas proteínas, que podem ser designadas como delta-endotoxinas, toxinas Cry ou proteínas Cry (Schnepf *et al.*, 1998), tornam-se tóxicas para muitas espécies de insectos após a ingestão e solubilização da proteína Cry, no intestino médio das larvas (Bravo & Soberón, 2008).

A busca de novos genes *cry*, que sintetizem novas proteínas Cry, com diferentes efeitos insecticidas tem sido uma das grandes metas na investigação em *B. thuringiensis* (Pinto *et al.*, 2010). Actualmente, já foram identificados mais de 500 genes *cry* diferentes e arrumados em 67 grupos (Cry1 a 67) (Crickmore *et al.*, 2010), sendo as proteínas Cry classificadas pela primeira sequência de aminoácidos e de acordo com a sua homologia de sequência (Crickmore *et al.*, 1998).

De entre as várias classificações, Frescata (2004) apresenta uma descrição simplificada, baseada em Figueiredo (1997), de toxinas Cry com maior interesse para o combate de pragas pertencentes a ordens de insectos com maior interesse do ponto de vista agrícola (Quadro 3).

Quadro 3 - Classificação das subspécies de *Bacillus thuringiensis*, com maior interesse para a limitação de pragas, em função da posse de diferentes genes codificadores de cristais proteicos (adaptado de Figueiredo (1997) por Frescata, 2004).

Subespécie de Bt	Subclasse de genes (Codificadores de cristais proteicos)	Ordem de insectos (onde têm acção insecticida)
<i>kurstaki</i>	<i>cry1A</i> (a, b, c) <i>cry2A</i> <i>cry2B</i>	Lepidoptera Diptera (só pelo <i>cry2A</i>)
<i>aizawai</i>	<i>cry1A</i> (a,b) <i>cry1C</i> <i>cry1D</i> <i>cry1E</i>	Lepidoptera
<i>tenebrionis</i>	<i>cry3A</i>	Coleoptera
<i>israelensis</i>	<i>cry4</i>	Diptera

Os genes *cry1* codificam proteínas tóxicas para lepidópteros; *cry2* codificam proteínas para lepidópteros e dípteros; *cry3* codificam proteínas Cry específicas para coleópteros e *cry4* para dípteros. (Crickmore *et al.*, 1998). No entanto, existem diferentes especificidades dentro do mesmo grupo de genes. É esta diversidade que determina a selectividade da actividade insecticida. Toxinas que são muito tóxicas para uma espécie podem ser pouco tóxicas para outras. Por exemplo, as três toxinas da estirpe *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* HD-1, Cry1Aa, Cry1Ab e Cry 1Ac, são tóxicas para lepidópteros, no entanto, cada uma delas tem níveis de toxicidade diferentes para diferentes espécies (Gill, 1995).

Para o caso de *H. armigera*, estudos sobre a sua susceptibilidade a diferentes toxinas Cry geralmente concordam em que Cry1Ac e Cry1Ab são as mais tóxicas, seguidas das Cry2A e Cry2B (Liao *et al.*, 2002). No entanto, entre as duas primeiras, Cry1Ac mostrou ser a mais tóxica, o que pode ser explicado pelo facto de possuir maior número de ligações e maior afinidade de ligação com receptores no intestino médio deste insecto (Estela *et al.*, 2004; Valaitis, 2011).

Embora estas toxinas tenham sido referidas como as mais tóxicas, estudos comprovam também a activação de outras toxinas no intestino médio de *H. armigera* como: Cry1Kh, Cry1Eb, Cry1Ka, Cry2Aa, Cry2Ab e Cry 2Af (Frankenhuyzen, 2009).

A maioria dos produtos desenvolvidos à base de *B. thuringiensis* para o combate de pragas de lepidópteros na agricultura é, no entanto, baseada em preparações de cristais parasporais derivadas da estirpe *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* (Btk) HD-1 que expressa Cry1Ac, Cry1Ab, Cry1Aa e Cry2Aa ou da estirpe HD-73 que produz Cry1Ac. São produtos pulverizáveis e têm como alvo larvas jovens (Bravo *et al.*, 2011).

3.2. Modo de acção

As toxinas Cry, detentoras do poder tóxico contra os insectos, são sintetizadas na forma de protoxinas (Aronson & Shai, 2001; Santosh & Singh, 2011). Desta forma a sua acção depende dos processos de activação que ocorrem no interior do aparelho digestivo do insecto (Ângelo *et al.*, 2010; Aronson & Shai, 2001).

De uma forma resumida, o mecanismo de acção realiza-se nos seguintes passos fundamentais: ingestão de *B. thuringiensis*, solubilização e activação da toxina no intestino médio do insecto, oligomerização, inserção de oligómeros na membrana do intestino médio do insecto, formação de poros, desregulação osmótica de células e morte de células (Fig. 8).

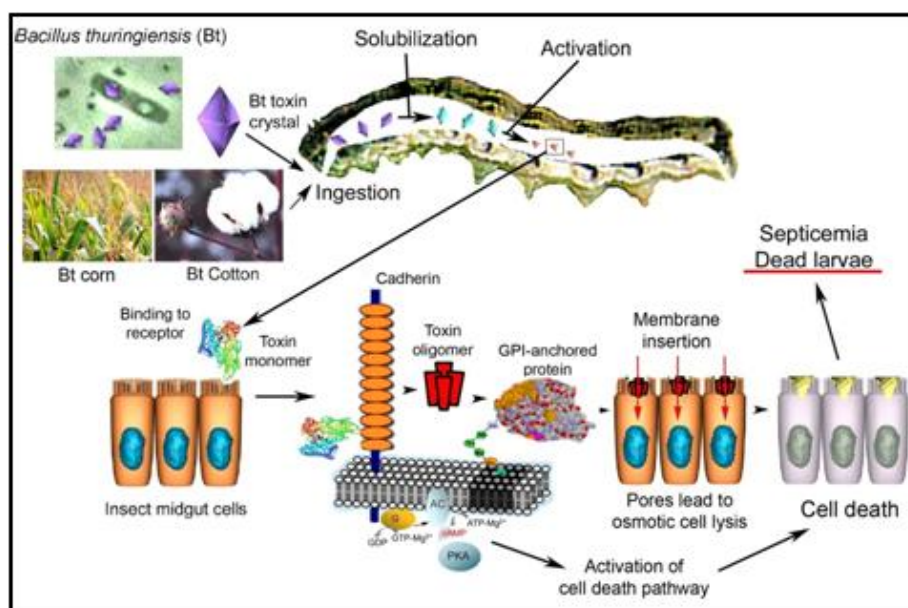


Figura 8 - Mecanismo de acção de *Bacillus thuringiensis* em insectos (Jurat-Fuentes, s/data).

Por ingestão, o cristal proteico é solubilizado no intestino médio do insecto, que nos lepidópteros é normalmente alcalino ($\text{pH} > 8$) para lepidópteros (Gill, 1995; Aronson & Shai, 2001). As protoxinas são clivadas por proteases e desta forma activadas, sendo posteriormente reconhecidas por receptores primários específicos presentes na BBMV (*Brush Border Membrane Vesicles*) das células epiteliais do intestino médio do insecto, aos quais se vão ligar. Os oligómeros resultantes destas ligações sofrem alteração na sua conformação e por alta afinidade ligam-se a receptores secundários.

Após o reconhecimento da toxina, esta provoca a formação de poros e um desequilíbrio iónico pelo aumento de transporte de K^+ e outros catiões para o interior da célula. Como resultado deste fenómeno dá-se a destruição das microvilosidades, hipertrofia de células epiteliais, vacuolização do citoplasma e lise celular. Dá-se a paralisia dos músculos e septicemia resultando na morte do insecto (entrada de bactérias, conteúdos intestinais na hemolinfa) (Gill, 1995; Schnepf *et al.*, 1998; Aronson & Shai, 2001; Bravo *et al.*, 2007 e 2008).

Estudos realizados com BBVM isolados de larvas de lepidópteros mostraram que a ligação de forte afinidade entre a toxina e o receptor é reconhecido como um factor importante na determinação do espectro insecticida das toxinas Cry (Pinto *et al.*, 2010).

3.3. Eficácia e persistência

Como referido anteriormente, as toxinas mais activas e tóxicas para as larvas de *H. armigera* são as Cry1Ac e Cry2Aa. No caso de Cry1Ac, as concentrações observadas para atingir níveis de LC_{50} variam entre 0,01 e 91,00 $\mu g.ml^{-1}$ (Ávilla *et al.*, 2005; Babu *et al.*, 2002; Chakrabarti *et al.*, 1998; Jalali *et al.*, 2004; Kranthi *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 1999). Já para a toxina Cry2Aa, os valores observados variaram entre 0,70 $\mu g.ml^{-1}$ e 6,3 $\mu g.ml^{-1}$ (Ávilla *et al.*, 2005; Babu *et al.*, 2002; Chakrabarti *et al.*, 1998).

A maior diferença de toxicidade verifica-se na Índia com um rácio entre Cry2Aa/Cry1Ac de 35 (Chakrabarti *et al.*, 1998) e 6,5 (Babu *et al.*, 2002) e 1,8 (Ávilla *et al.*, 2005) em Espanha. É na Índia também que se verifica maior susceptibilidade a estas duas toxinas de *B. thuringiensis*, relativamente a Cry1Ac (Chakrabarti *et al.*, 1998; Kranthi *et al.*, 2010) e a Cry2Aa (Babu *et al.*, 2002). A susceptibilidade das larvas de *H. armigera* também varia entre populações de diferentes regiões, como se observou na China (Wu *et al.*, 1999) e na Índia (Kranthi *et al.*, 2010). Na Austrália, Liao *et al.* (2002) referiu diferenças entre as duas toxinas com um rácio de diferença de 1,3, semelhante a Espanha (Ávilla *et al.*, 2005), no entanto, para doses de 0,115 $\mu g/cm^2$ e 0,149 $\mu g/cm^2$ para Cry1Ac e Cry2Aa, respectivamente. Embora estes resultados tenham sido obtidos em condições laboratoriais, a dieta artificial utilizada variou nestes ensaios. Este facto pode explicar as diferenças observadas visto a alimentação poder influenciar quer o desenvolvimento de *H. armigera* quer a eficácia do patógeno. A susceptibilidade das populações de diferentes regiões pode também ser distinta, o que poderá também contribuir para as diferenças referidas. Li & Bouwer (2012) verificaram valores de LD_{50} para outras toxinas. Verificaram também em larvas neonatas, que depois de Cry1Ac ($3,14 \times 10^{-2}$ ng) e Cry2Aa ($1,39 \times 10^{-1}$ ng) as proteínas mais tóxicas foram, por ordem decrescente: Cry1Ab ($6,10 \times 10^{-1}$ ng), Cry1Aa ($1,02 \times 10^1$ ng), Cry1Ca ($6,44 \times 10^2$ ng), Cry9Aa ($7,84 \times 10^2$ ng), embora no segundo instar larvar de *H. armigera*, Cry1Ab tenha sido mais tóxica que Cry2Aa ($5,30 \times 10$ ng e $5,26 \times 10^1$ ng, respectivamente). No entanto, Kranthi *et al.* (2010) observaram na Índia que a toxina Cry1Aa é mais tóxica que Cry1Ab (LC_{50} : 0,07-0,99 $\mu g.ml^{-1}$ e 0,69-9,94 $\mu g.ml^{-1}$, respectivamente). Outros valores mais

baixos relativos à toxicidade de Cry9Aa e Cry1C foram observados por Liao *et al.* (2002) (LD_{50} : 4000 ng/cm² para Cry1C e Cry9Aa).

Alguns estudos relataram também os efeitos sub-letais no que diz respeito à inibição de alimentação e crescimento das larvas de *H. armigera*. Babu *et al.* (2002) observaram que 90% da população sofre efeitos sub-letais em baixas concentrações com baixa mortalidade (< 30%), ou seja com 0,0625 µg.ml⁻¹ para Cry1Ac e 1,00 µg.ml⁻¹ para Cry2Aa. A uma concentração comparável entre as duas toxinas (0,50 µg.ml⁻¹) observaram 99,3% e 89,9% de inibição de crescimento para Cry1Ac e Cry2Aa, respectivamente, sendo Cry1Ac de novo a toxina que causa mais efeitos sub-letais nas populações de *H. armigera*, conclusão a que chegaram também Li & Bouwer (2002). Wu *et al.* (1999) observaram para uma concentração de 6 µg.ml⁻¹ cerca de 62% de inibição das larvas da população de Pequim, a qual obteve um LC_{50} de 1,55 mg.ml⁻¹, e para a mesma população observou 98% de inibição a uma concentração de 1,6 mg.ml⁻¹. Por outro lado, Kranthi *et al.* (2000) observaram 50% de inibição de crescimento em larvas de *H. armigera* com Cry1Ac a 0,014 mg.ml⁻¹. Em relação a efeitos sub-letais há também variabilidade em larvas de *H. armigera* de diferentes populações, tal como se mencionou para as concentrações e doses letais.

No que diz respeito a diferenças de susceptibilidade entre instares, Bird & Akhurst (2007) demonstraram que os primeiros três instares larvares são os mais susceptíveis aos efeitos sub-letais que Cry1Ac provoca (IC_{50} : 0,39 a 1,3 µg.ml⁻¹ (1º ao 3º instar); 3,2 a 11,5 µg.ml⁻¹ (3 ao 4º instar)). No entanto, neste estudo, demonstrou-se também que estes instares são mais susceptíveis à toxina Cry1Ab (IC_{50} : 0,14 a 0,60 µg.ml⁻¹).

Em laboratório, Babu *et al.* (2002) observaram a mortalidade durante 7 dias para Cry1Ac e Cry2Aa e obtiveram valores médios próximos de LC_{50} desde o 1º ao 4º dia após o tratamento. A mortalidade acumulada dos 7 dias foi de 50% para ambas as toxinas. A maior parte da mortalidade acumulada obtida foi verificada no 1º dia no caso da exposição a Cry2Aa, enquanto Cry1Ac teve acção inicialmente lenta, crescendo apenas a mortalidade a partir do 2º e 3º dia após o tratamento. Na cultura de algodão, Mensah *et al.* (2007) observaram a persistência das toxinas de *B. thuringiensis* durante o mesmo período de tempo e concluíram que no primeiro dia a taxa de mortalidade das larvas de *H. armigera* foi de 70%, a mais elevada dos 7 dias, diminuindo ao longo do tempo até 16%. Observaram que a sua meia-vida foi de 1,49 dias. Bailey *et al.* (1996) verificaram na vinha, a mortalidade de larvas neonatas de *Epiphyas postvittana* (Walker) (Lepidoptera: Tortricidae), e observaram que a mortalidade decresce de 80% para menos de 50%, quando existe uma exposição solar de 2 horas nas folhas tratadas com *B. thuringiensis*, e no 2º dia a mortalidade decresce para 20%. Quando não exposto à luz solar, a mortalidade é de 60% passadas 32 h.

Relativamente aos estragos causados em tomate existem alguns estudos de Kumar & Kumar (2004) e Mandaokar *et al.* (2000) sobre tomate transgénico. Em tomate transgénico que expressa a toxina Cry1Ab, Kumar & Kumar (2004) observaram que os únicos estragos causados, quando comparado ao

tomate não-transgênico, ocorreram durante a infestação de larvas neonatas que tentaram alimentar-se das folhas terminais. Não foram encontradas larvas de instares mais avançados nas plantas transgênicas. Mandaokar *et al.* (2000), por outro lado, estudaram, em laboratório, tomate transgênico com expressão de Cry1Ac e verificaram também a elevada protecção que conferida contra larvas de *H. armigera*: a percentagem de frutos atacados nas plantas não transgênicas foi de 48% e nas plantas transgênicas variou entre 2,00 e 4,54%.

Na cultura da batata, *B. thuringiensis* causou mortalidades entre 10-23% (Kroschel, 1995) e 36-76% (Arthurs *et al.*, 2008) de mortalidade de larvas de *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae), em tubérculos à colheita, e 41-54% em folhas (Kroschel, 1995).

3.4. Resistência

Devido às características dos bioinsecticidas à base de *B. thuringiensis*, estes produtos são muito utilizados e o seu uso repetitivo pode levar a criar mecanismos de resistência por parte dos insectos, tal como tem vindo a acontecer com os insecticidas convencionais.

Quando ocorre alguma anomalia na activação da toxina e nos processos enzimáticos que envolvem todo este mecanismo de acção, a toxicidade da proteína pode ser posta em causa. Na verdade, os mecanismos de resistência podem envolver: a não ligação da toxina aos receptores da BBMV, incapacidade de criar poros na membrana do epitélio e a sua baixa eficiência pela rápida reparação dos danos causados pela toxina nas células infectadas (Ferré & Rie, 2002; Machado & Fiuza, 2010).

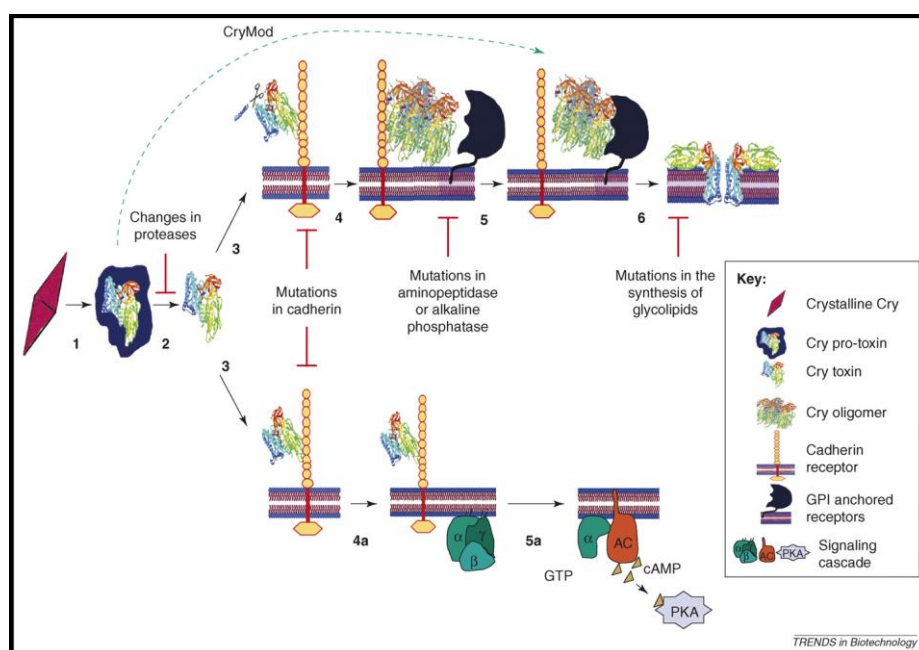


Figura 9 - Modelos do modo de acção das toxinas Cry e resultante mecanismo de resistência (Bravo & Soberón, 2008).

De todos os casos, o mecanismo mais comum que envolve a resistência às toxinas de *B. thuringiensis* em lepidópteros é a redução na capacidade de ligação aos receptores da BBMV (Fig. 9), envolvendo alterações nos receptores de ligação (Ferré & Rie, 2002; Bravo *et al.*, 2011). Este é conhecido como o “Modo 1 de resistência”, onde se inclui não só a redução de ligação da toxina Cry1A, mas também resistência-cruzada de Cry1Aa, Cry1Ac e algumas Cry1C (Xu *et al.*, 2005; Bravo *et al.*, 2011).

Para as toxinas Cry1Ac existem pelo menos quatro tipos de receptores de ligação para diferentes lepidópteros: “cadherin-like proteins” (CADR), “glycosylphosphatidyl-inositol (GPI)-anchored alkaline phosphatase” (ALP), “GPI-anchored aminopeptidase-N” (APN) e “270 kDa glycoconjugate”. Foram encontradas, em várias espécies, modificações nos genes que codificam estes receptores para as proteínas Cry e a maioria parece afectar as ligações a receptores primários CADR, embora também tenham sido detectados casos de alterações nas ligações a receptores secundários: APN e ALP (Zhang *et al.*, 2009; Jurat-Fuentes *et al.*, 2011).

No caso de *H. armigera*, a maioria das causas de resistência à toxina Cry1Ac de *B. thuringiensis* estão também associadas a mutações nas ligações aos receptores primários (CADR). No conjunto dos trabalhos de Xu *et al.* (2005), Yang *et al.* (2006), Yang *et al.* (2007) e Peng *et al.*, (2010) e Zhao *et al.* (2010), foram detectados oito alelos (r_1 , r_2 , r_3 , r_4 , r_5 , r_6 , r_7 , r_8) que conferem resistência a Cry1Ac associados a *H. armigera*.

Xu *et al.* (2005) identificaram um codão de *stop* no alelo r_1 do gene Ha_BtR (gene que codifica o local de ligação em *H. armigera*), o qual se espera bloquear a produção de locais de ligação e fazer com que as toxinas de *B. thuringiensis* percam o receptor específico de ligação no intestino médio de *H. armigera*.

Yang *et al.* (2006) encontraram uma deleção no alelo r_1 , entre o exão 8 e 35, a qual é responsável pela criação de uma proteína truncada (i.e. uma proteína encurtada sem actividade) na toxina, fenómeno que confere resistência em *H. armigera*. Noutro estudo de Yang *et al.* (2007), observaram-se inserções nos alelos r_2 e r_3 de Ha_BtR e identificadas como LTR-RT (“Long terminal repeat retrotransposon”, o qual foi denominado de *HaRT1*). Esta inserção ocorreu exactamente no mesmo local do gene Ha_BtR (exon 8) e resultou, também, numa proteína truncada conferindo resistência à toxina Cry1Ac em *H. armigera*.

Zhao *et al.* (2010), no seguimento destes estudos detectaram 12 alelos ligados geneticamente a três espécies de lepidópteros: um em *Heliothis virescens*, três em *Pectinophora gossypiella* e oito em *H. armigera*. Dos oito alelos de *H. armigera*, 3 (r_1 , r_2 e r_3) são semelhantes aos três descritos anteriormente. Peng *et al.* (2010) também encontrou uma mutação em *HacadiI* (fragmento “cadherin” que contém local de ligação com a toxina) que levou à alteração da toxicidade de Cry1Ac para larvas de *H. armigera*. A esse fragmento foram retirados os resíduos, $^{1423}\text{GVLSNPQ}^{1430}$, e a consequente mutação perdeu a habilidade de se ligar à proteína e a toxicidade foi significativamente reduzida, comprometendo a formação de oligómeros.

Para além das mutações descritas dos receptores de ligação, associadas aos fenómenos de resistência, existem casos de resistência cruzada detectados entre as próprias toxinas de *B. thuringiensis* no intestino médio de larvas de *H. armigera*. Estudos de Estela *et al.* (2004) revelaram que Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac competem em locais de ligação comum, mas Cry2A não partilha locais de ligação com Cry1Ac, dados que são confirmados por Xu *et al.* (2005). Estas proteínas não possuem necessariamente níveis elevados de similaridade nas suas sequências.

Ferré & Rie (2002) põem a hipótese se considerar a utilização destas toxinas Cry, com diferentes locais específicos de ligação, para as estratégias de combate às resistências de *B. thuringiensis*.

3.5. Ecotoxicologia

Bacillus thuringiensis é isento de classificação toxicológica, sendo inofensivo para o ambiente e organismos não-alvo (EFSA, 2012a; EPA, 1998; Sanco, 2008a).

Das subspécies de *B. thuringiensis* apenas a subspécie *aizawai* (estirpe ABTS-1857) apresenta efeitos tóxicos em ratos e potencial de sensibilização em humanos (Sanco, 2008b e 2008c). As subspécies *tenebrionis*, *israelensis* e *kurstaki* não apresentam efeitos tóxicos em mamíferos (Sanco, 2008d a 2008h). Observou-se irritação ligeira quando inalado ou por contacto, no entanto sem efeitos tóxicos (EPA, 1998). Não se verificaram efeitos de toxicidade aguda nem crónica em aves ou organismos aquáticos (EPA, 1998). Relativamente ao consumidor e aplicador não foram finalizados testes na UE (EFSA, 2012a). Não é cancerígeno, teratogénico ou mutagénico (Anónimo, 1994; EPA, 1998). Apresenta potencial mutagénico nos tecidos das plantas, no entanto, apenas com uso extensivo e continuado ganha esse potencial (Anónimo, 1994).

Não foram encontradas informações sobre o efeito de *B. thuringiensis* em organismos não-alvo (inimigos naturais de pragas e outros auxiliares) na UE (EFSA, 2012a), no entanto, de acordo com a EPA (1998), não foi observada toxicidade directa a insectos predadores nem parasitas, sendo que qualquer efeito parece ser provocado indirectamente. Em estudos de campo, em insectos que não os alvos principais e seus respectivos inimigos naturais, não foram encontrados grupos de espécies que fossem afectados (EPA, 1998). Da pesquisa efectuada em empresas especializadas em na produção e venda de auxiliares artrópodes, disponibilizados pela Koppert (s/data) e Biobest (s/data), *B. thuringiensis* é classificado como inofensivo (< 25% de mortalidade) para a maioria das espécies testadas pertencentes às classes Neuroptera, Hymenoptera, Coleoptera e outros artrópodes (ver Anexo I - Quadro 2). De acordo com EPA (1998), apenas *B. thuringiensis* ssp. *aizawai* indicou toxicidade alta para abelhas melíferas enquanto *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki*, *B. thuringiensis* ssp. *israelensis* e *B. thuringiensis* ssp. *tenebrionis* mostraram baixa toxicidade.

Comparativamente a outros insecticidas, *B. thuringiensis* apresenta baixos riscos para o ambiente (EFSA, 2012a). Rapidamente se degrada quando exposto à luz ultravioleta, possuindo uma meia-vida de aproximadamente 4 dias, em condições normais de luz (Anónimo, 1994; EPA, 1998).

No solo pode persistir durante vários meses em condições de campo (EFSA, 2012a), sendo rapidamente inativado a pH inferiores a 5,1 (Anónimo, 1994).

B. thuringiensis pode ser eficaz até 48h na água e depois sedimenta ou adere gradualmente às partículas orgânicas em suspensão (Anónimo, 1994), no entanto e devido à sua rápida degradação e baixa toxicidade não apresenta problemas na água (Anónimo, 1994; EPA, 1998). Da mesma maneira, *B. thuringiensis* não é indicado como potencial contaminante na água de consumo. A baixa percolação através do solo e os tratamentos municipais da água de consumo reduzem a possibilidade de exposição a *B. thuringiensis* através dessa água. As proteínas de *B. thuringiensis* são rapidamente degradadas no solo e por isso o potencial de transferência para a água de consumo é mínima ou inexistente (EPA, 1998). Relativamente à informação disponível por EFSA (2012a) não existe qualquer referência sobre este insecticida nos sistemas de análise para o controlo de qualidade de água potável previsto na directiva 98/83/CE.

Na vegetação, *B. thuringiensis* tem reduzida meia-vida devido à luz ultravioleta que o degrada rapidamente e a chuva lava-o para o solo. Não é fitotóxico para as plantas e não mostrou efeitos adversos sobre as sementes ou vigor da planta (Anónimo, 1994).

As frases de risco podem ser consultadas no Quadro 1 do Anexo I deste trabalho de acordo com a informação disponível em DGAGR (2012).

4. SPINOSADE

4.1. Descrição

Saccharopolyspora spinosa Mertz & Yao (Actinomycetales) é uma bactéria filamentosa existente no solo. Foi, pela primeira vez, identificada em amostras de solo e é caracterizada pelas suas hifas de cor rosa-amarelada pálida, as quais têm organização filamentosa, muitas vezes ramificada, com cadeias de esporos (Mertz & Yao, 1990). Da fermentação aeróbia desta actinomiceta resultam metabolitos secundários, inicialmente designados por A83543 (Mertz & Yao, 1990; Kirst, 2010), as spinosinas. (Sparks *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2008; Kirst, 2010).

Da família das spinosinas, as mais activas são a spinosina A e a spinosina D, embora existam outras com outros níveis de metilação diferentes e significativamente menos activas (Kirst, 2010). Normalmente, esta mistura natural (Sparks *et al.*, 2001) ocorre num rácio de 85:15 (OIMR, 2002; Kromp s/data), considerando outras spinosinas como impurezas (OIMR, 2002). A diferença entre estas duas spinosinas reside apenas num grupo metil adicional que substitui um hidrogénio em spinosina D (Fig. 10) (Waldron *et al.*, 2000). A esta mistura natural de spinosina A e spinosina D deu-se o nome de spinosade.

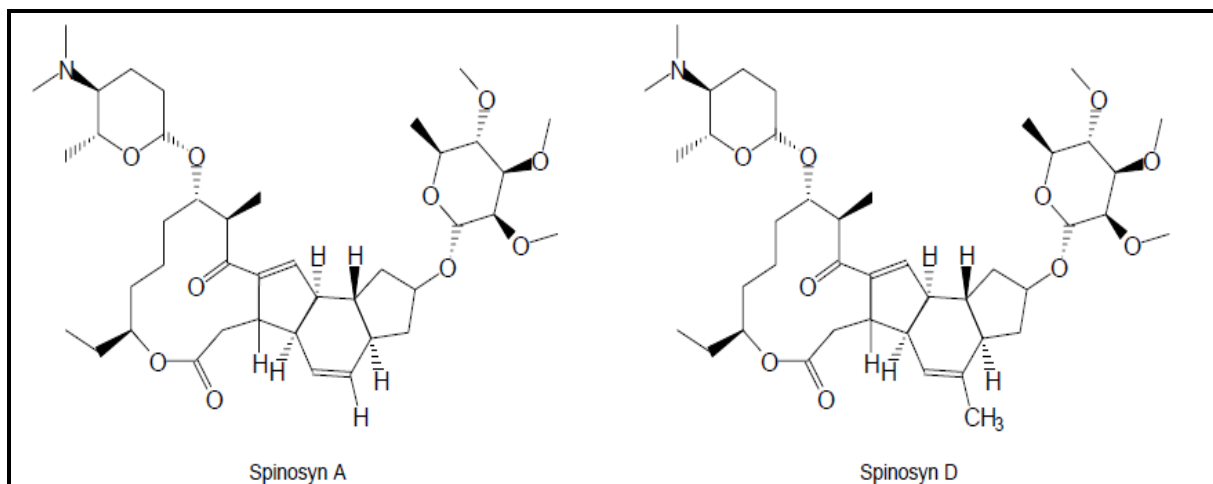


Figura 10 - Esquema da constituição das spinosinas A e D. Fórmulas empíricas de spinosina A: C₄₁H₆₅NO₁₀; Fórmula empírica de spinosina D: C₄₂H₆₇NO₁₀ (DowAgroscience, 2001a).

Estruturalmente são macrólidos constituídos por lactonas tetracíclicas aos quais se ligam dois açúcares: D-forosamine (aminoaçúcar) e L-ramnose (açúcar neutro). (Salgado, 1998; Thompson *et al.*, 2000; Waldron *et al.*, 2000; Madduri *et al.*, 2001; Sparks *et al.*, 2001; Kirst, 2010; Kollman, s/data).

Em 1997, descobertas as suas potencialidades como insecticida, a DowAgroscience (2001b) formulou, pela primeira vez, um insecticida com base nesta substância activa – spinosade. Os dois açúcares que o

compõem estruturalmente são essenciais para a actividade insecticida de spinosade (Sparks *et al.*, 2001). Actualmente, spinosade é utilizado como substância activa em vários insecticidas pelo mundo inteiro.

4.2. Modo de acção

O spinosade é caracterizado por possuir um modo de acção único e de acção rápida. Apresenta largo espectro de actividade contra ordens de insectos como Diptera, Hymenoptera, Thysanoptera e alguns Coleoptera, tendo maior actuação em lepidópteros (Salgado, 1998; DowAgroscience, 2001a e 2001b). O seu modo de acção mais eficaz é por ingestão. No entanto, pode agir por contacto (ovo, larva e adulto), sendo que nos ovos deve ser pulverizado directamente e nas larvas e adultos é eficaz por contacto com áreas tratadas (DowAgroscience, 2001b).

De acordo com IRAC (2011), pelo seu modo de acção, está inserido no Grupo 5: “Nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) allosteric modulators”; ou seja, activa receptores acetilcolina nicotínicos (nAChRs) através da alteração da sua estrutura terciária ou quaternária, regulando assim a actividade destes receptores, sendo referido como o maior excitante neuro-transmissor do Sistema Nervoso Central (SNC) do insecto.

Existem estudos que indicam que spinosade interage com receptores nACh e GABA (ácido γ -aminobutírico) (Watson, 2001; Wang *et al.*, 2008; Orr *et al.*, 2009; Kirst, 2010), embora spinosina A não pareça interagir directamente com alvos conhecidos de outros insecticidas (Orr *et al.*, 2009), como imidaclopride e outros insecticidas nicotínicos (Thompson *et al.*, 2000).

O spinosade parece afectar os receptores conhecidos por mecanismos ainda não completamente determinados (Sparks *et al.*, 2001). O efeito que pode ter na ligação dos receptores conhecidos de outros insecticidas pode ser positivo ou negativo (Orr *et al.*, 2009; Kirst, 2010); daí ser necessário conhecer o mecanismo que envolve o modo de acção para prever mecanismos de resistência.

Depois de o insecto ingerir spinosade, o sistema nervoso é activado através da interacção com nAChRs e secundariamente com receptores GABA (Wang *et al.*, 2009a; Kollman, s/data). As spinosinas conseguem interromper a função de receptores GABA nos pequenos neurónios do SNC (Sparks *et al.*, 2001).

Como primeiro efeito, as spinosinas vão induzir excitação e, posteriormente, a inibição da transmissão neuromuscular, causando perda de controlo muscular, tremores pela excitação dos neurónios do SNC do insecto (Fig. 11) e, depois, a paralisia através da fadiga neuromuscular criada por uso excessivo e, por fim, a morte (Salgado, 1998; Watson, 2001; Ghosh *et al.*, 2010; Kollman, s/data; Krump, s/data).

Salgado (1998) refere ainda que spinosade pode estimular directamente o SNC quando aplicado a gânglios isolados em muito pequenas concentrações. Aparentemente, a fadiga neuromuscular é causada por uso excessivo e não por efeito directo, excepto quando em altas concentrações.

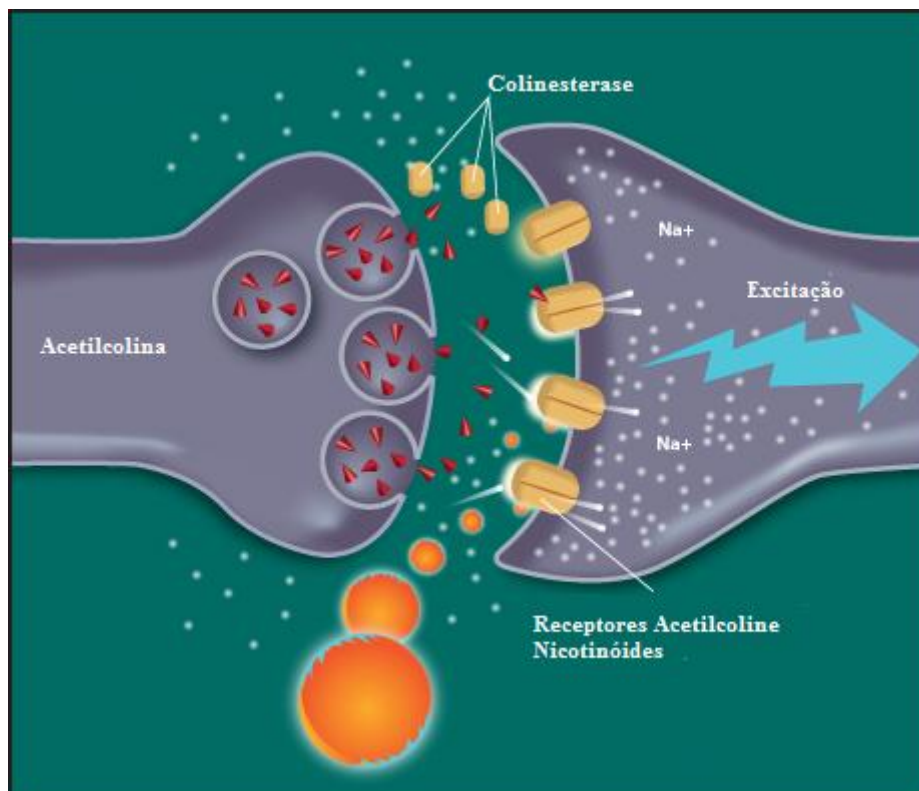


Figura 11 - Modo de acção de spinosade (Natroba, 2011).

4.3. Eficácia e persistência

Vários autores classificam spinosade como possuindo elevada toxicidade e eficácia contra *H. armigera* (Gosh *et al.*, 2010; Kranthi *et al.*, 2000; Ramasubramanian & Regypathy, 2004; Khan & Jamil, 2007; Wang *et al.*, 2008; Vojoudi *et al.*, 2011).

Quando comparado a outras substâncias activas, spinosade mostra ser mais eficaz do que endossulfão, quinalpos, abamectina, lambda-cialotrina e cipermetrina e equiparado com clorpirifos, mas com a vantagem de possuir menor risco para o ambiente (Kranthi *et al.*, 2000; Gosh *et al.*, 2010; Vojoudi *et al.*, 2011).

Gosh *et al.* (2010) observaram, na cultura do tomate, a eficácia de spinosade a diferentes doses (45, 56, 73 e 84 mg/ha s.a.) e outros insecticidas (cipermetrina, lambda-cialotrina, quinalpos), relativamente a *H. armigera*. Verificaram que a maior eficácia na redução da população de *H. armigera* (100%) foi obtida com as doses de spinosade de 73 e 84 g/ha, mantendo estes valores de mortalidade sete dias após a pulverização, e que se observou menor percentagem de frutos atacados (2,1-2,4%).

Wang *et al.* (2008) também observaram a taxa de mortalidade depois de 48h e 72h para diferentes concentrações de spinosade, embora em laboratório. Observaram entre 10% a 75% de mortalidade para concentrações entre 0,04-0,60 mg.kg⁻¹ de spinosade em dieta; os valores de LC₅₀ foram de 0,41mg.kg⁻¹ e 0,35mg.kg⁻¹ passadas 48h e 72h, respectivamente. Ahmad *et al.* (2003) observaram que

para concentrações entre 3,19-12,1 mg.l⁻¹ ocorreu mortalidade de 50% em diferentes populações de larvas de *H. armigera*; Wang *et al.* (2009a) e Ramasubramanian & Regypathy (2004) verificaram LC₅₀ entre 5,8 e 56,3 mg.L⁻¹ e 170,23 ppm (mg.l⁻¹), respectivamente. Kranthi *et al.* (2000) verificaram LD₅₀ de 0,023 a 0,245 µg.larva⁻¹. Tal como para as toxinas de *B. thuringiensis*, referido anteriormente, a eficácia de spinosade varia geograficamente, devido a diferenças interpopulacionais, o que se pode constatar a partir das concentrações e doses referidas pelos vários autores.

O spinosade também apresenta diversos efeitos sub-letais para as populações de *H. armigera*, nos diferentes estados de desenvolvimento. Wang *et al.* (2008) observaram diferenças significativas não só no aumento do período de desenvolvimento, mas também na fecundidade, fertilidade e emergência de adultos. Observaram que a emergência dos adultos diminuiu de 98,97% (testemunha) para 68,26% e para 64,74%, com concentrações de spinosade em dieta de 0,04 mg.kg⁻¹ e 0,16 mg.kg⁻¹, respectivamente; o desenvolvimento da pré-pupa foi mais lento e dependente da concentração; a longevidade diminuiu (de 11,17 para 8,63 dias); a fecundidade das fêmeas diminuiu de 894 para 315 ovos; e a percentagem de ovos eclodidos diminuiu de 93,26% para 32,64%.

No entanto, Vojoudi *et al.* (2011) não observaram efeitos sub-letais significativos quando comparado com outros insecticidas.

Estes efeitos sub-letais que spinosade pode provocar podem afectar não só as futuras gerações como influenciar a altura em que a praga surge, pelos efeitos que tem nos atrasos do desenvolvimento larvar e pupal.

Sobre a persistência de spinosade existem poucos estudos, sendo estes praticamente inexistentes para *H. armigera* na cultura do tomate. No entanto, dos dados existentes noutras culturas observa-se que a persistência desta s.a. varia consoante as condições de luz a que spinosade é exposto, já que a sua forma principal de degradação é a fotólise, e também depende da precipitação. A sua persistência é elevada, podendo manter a actividade insecticida no mínimo até 25 dias após a pulverização (Liu *et al.*, 2010). A mortalidade que provoca em larvas de várias pragas é elevada desde o 1º-2º dia após a sua aplicação, sendo mais eficaz nos primeiros instares larvares (L₁-L₂), diminuindo a sua eficácia ao longo do desenvolvimento larvar (Duffield & Jordan, 2000; Brévault *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010). No entanto, existem casos em que se observou acção significativa redução das populações apenas passadas 48h (Santis *et al.*, 2011) ou 3-5 dias (Murray *et al.*, 2005).

No algodão, Brévault *et al.* (2009) observaram que spinosade é um dos insecticidas mais persistentes quando comparado com outras substâncias activas, possuindo elevada eficácia durante 17,4 dias e que decresce para 8,9 dias em condições de precipitação. A actividade inicial de spinosade provoca entre 62,3-68,0% de mortalidade em L₁-L₂ e 48,5-55,2% em L₃-L₅ em larvas de *H. armigera*, quando comparado com endossulfão e tiocarbamatos que, independentemente do instar, provocam entre 89,5-94,1% e 94,1-99,2%, respectivamente. Ao longo de 14 dias, a mortalidade de larvas de *H. armigera*, provocada por spinosade, decresce de 100% para aproximadamente 60%. No entanto, os valores

situam-se entre 95-100% até cerca do 8º dia, com um ligeiro decréscimo entre o 6º e 8º dia para 85%, diminuindo a partir daí até ao 14º dia do ensaio.

Duffield *et al.* (2000) também observaram a persistência de spinosade, em soja, ao longo de 7 dias após a aplicação, e concluíram que provoca elevada mortalidade larvar em *H. armigera*, tendo a sua eficácia decrescido de 100% para 40%. Já Santis *et al.* (2011) observaram em folhas de pimenteiro a persistência de spinosade para *Spodoptera exigua* (Hbn.) (Lepidoptera: Noctuidae) e verificaram que a mortalidade aumentava entre as 24 e 48h de 20-40% para 80% e que se mantinha neste valor até às 144h seguintes (6 dias).

Em cultura de couve, Liu *et al.* (1999) observaram, para larvas de *Trichoplusia ni* (Hbn) (Lepidoptera: Noctuidae), que passados 12 dias em condições laboratoriais, a mortalidade decresceu de 100% para 23% (L₂) e 85% (L₃). Já em ensaios de campo, Liu *et al.* (2010) observaram a elevada persistência de spinosade para larvas de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), a qual manteve o nível de estragos abaixo do nível económico de ataque, em valores de 0,4 %, desde o dia 14 ao dia 25 após a pulverização.

Daglish *et al.* (2008) também observaram uma persistência elevada de spinosade, à qual correspondeu 100% de mortalidade de larvas de *Rhyzopertha dominica* (Fab.) (Coleoptera: Bostrichidae), em trigo armazenado, ao fim de 14 dias. Neste caso, a elevada persistência de spinosade, durante os 14 dias do ensaio, deve-se ao facto de este não ter estado exposto à luz, o que aumenta a meia-vida da substância activa.

4.4. Resistência

Para *H. armigera*, os casos de resistência detectados permanecem a níveis muito baixos, ou nem sequer mostram indícios de existir resistência.

Ramasubramanian & Regypathy (2004) aplicaram sinergistas para identificar a existência de resistência e verificaram que nas populações de Tami Nadul, na Índia, as populações foram 100% susceptíveis a spinosade, tal como verificaram Kranthi *et al.* (2000). Já Ahmad *et al.* (2003) observaram, também na Índia, 5% de resistência em duas populações do total de cinco seleccionadas para o estudo. Na Austrália, Gunning & Balfe (2002) observaram que 10% das populações de *H. armigera* mostraram resistência a spinosade, tendo havido um aumento significativo entre 1999/2000 e 2002. Mais recentemente, Wang *et al.* (2009a e 2009b) observaram o desenvolvimento da resistência entre gerações de *H. armigera*, onde estudaram possíveis efeitos de resistência cruzada e possível relação de sinergistas (PBO, TPP e DEM) e enzimas metabolizantes com a aquisição de mecanismos associados à resistência. Wang *et al.* (2009b) observaram que os níveis de resistência se mantiveram a níveis baixos até à 7ª geração (ou foram mesmo inexistentes) e que aumentaram exponencialmente até à 9ª geração sendo as diferenças, à 15ª geração, significativas para a geração parental (LC₅₀: 1,26 a 30,3 ug.g⁻¹). Estes autores também verificaram que não existiam evidências de resistência cruzada

entre vários pesticidas e spinosade, a nível de LC_{50} , apenas detectando baixos níveis de resistência cruzada com fenvalarato, os quais não foram detectados para LC_{99} .

Em ambos os estudos de Wang *et al.* (2009a e 2009b) observaram-se aumentos de toxicidade de spinosade para *H. armigera* relacionados com sinergistas TPP e PBO e enzima metabolizadora ODM, o que pode levar a crer que estas enzimas e sinergistas possam ter um papel importante no metabolismo de spinosade, associado aos mecanismos de resistência de *H. armigera*. No entanto, a informação sobre este papel das enzimas e sinergistas é reduzida, sendo, por isso, necessário a realização de mais estudos para uma maior compreensão deste assunto.

Embora os valores de resistência permaneçam em níveis muito baixos ou sejam mesmo inexistentes, estes indícios servem de aviso para o efeito do uso continuado de novas substâncias activas. Embora não existam problemas maiores de momento, estes podem ser desenvolvidos no futuro.

4.5. Ecotoxicologia

O spinosade é classificado como um insecticida de baixo risco ambiental. Para o Homem os riscos são reduzidos, não sendo cancerígeno, mutagénico ou teratogénico (EPA, 2011; Sanco, 2006), de acordo com o que se conhece actualmente. Não apresenta riscos para o consumidor a curto ou longo prazo (EFSA, 2012b; Sanco, 2006).

Apresenta baixa toxicidade para mamíferos e aves (DowAgroscience, 2001a; EPA, 2011) e observam-se efeitos de toxicidade aguda e crónica em organismos aquáticos (Sanco, 2006). Os microrganismos do solo mostraram ser susceptíveis a spinosade; por exemplo, os produtos à base de spinosade que têm como alvo formigas. (DowAgroscience, 2001a e 2001b).

De acordo com os dados disponíveis (Biobest, s/data; Koppert, s/data; ver Anexo I - Quadro 2), spinosade apresenta-se como muito tóxico para parasitóides: *Encarsia formosa* (Gahan) (Hymenoptera: Aphelinidae), *Eretmocerus mundus* (Mercet) (Hymenoptera: Aphelinidae), *A. colemani*, *Trichogramma evanescens* (Westwood), *Opius pallipes* (Wesmael) (Hymenoptera: Braconidae); e predadores: *A. swirskii*, *Amblyseius cucumeris* (Oudemans) (Acari: Phytoseiidae), *C. carnea*, *Feltiella acarisuga* (Vallot) (Diptera: Cecidomyiidae), *M. caliginosus*, *O. laevigatus*, *Podisus maculiventris* (Say) (Heteroptera: Pentatomidae). Os predadores geralmente sofrem efeitos sub-letais menos relevantes por exposição a spinosade, enquanto os parasitóides sofrem diminuição de capacidade de reprodução e redução de longevidade, entre outros aspectos (William *et al.*, 2003). No entanto, devido ao facto de spinosade se degradar rapidamente, espécies mais sensíveis conseguem recompor-se entre 7 a 14 dias após a sua aplicação (William *et al.*, 2003). No que se refere a polinizadores, é muito tóxico para *Apis mellifera*, embora passado algumas horas, quando o resíduo seca, se observe uma redução da toxicidade (Milles, 2003).

As principais formas de dissipação e transformação de spinosade no ambiente, após a sua aplicação, passam pela fotodegradação e biotransformação na superfície das plantas, hidrólise abiótica, fotólise

na água, fotodegradação no solo e biotransformação através de microrganismos do solo (DowAgroscience, 2001a e 2001b; Kollman, s/data; Sanco, 2006). O factor determinante para a meia-vida de spinosade é, sem dúvida, a presença de luz, pois a fotodegradação é o processo de inactivação mais importante (Hale & Portwood, 1996; DowAgroscience, 2001a e 2001b; Kollman, s/data).

Na água, na ausência de luz, a persistência é maior, pois a degradação é menor apenas com o processo de hidrólise (Hale & Portwood, 1996; Saunders & Bret, 1997; DowAgroscience, 2001b). Apresenta uma meia-vida de 200 dias a pH 9, sendo relativamente estável a pH 5 - 7 (Hale & Portwood, 1996; Sanco, 2006). Na presença de luz, a sua meia-vida é menor que 1 dia (Hale & Portwood, 1996; DowAgroscience 2001b; Sanco, 2006).

No solo é degradado, através da fauna microbiana, em outras spinosinas que podem aí persistir durante alguns meses e continuar biologicamente activas (Saunders & Bret, 1997). A meia-vida no solo, na ausência de luz, é de 9-17 dias a 25°C (Hale & Portwood, 1996; DowAgroscience, 2001b) e de 5 a 68 dias a 20°C (DowAgroscience, 2001b).

Nas plantas a degradação é moderadamente rápida à superfície da folha, sendo a fotólise o processo dominante (Kollman, s/data; DowAgroscience, 2001b). Após a foto-degradação os resíduos ficam disponíveis para processos bioquímicos da planta (Kollman, s/ data). A meia-vida pode ir de 2 a 16 dias (Hale & Portwood, 1996; DowAgroscience 2001b).

Como para *B. thuringiensis*, também para esta s.a. se podem encontrar, no Quadro 1 do Anexo I deste trabalho, as frases de risco dos produtos formulados à base de spinosade, de acordo com DGADR (2012).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Cultura de tomate

Para o estudo dos insecticidas no combate à lagarta-do-tomate foi necessário realizar uma cultura de tomate, a qual foi instalada com uma estufa numa área de 11 x 14,5 m², disponibilizada pelo Instituto Superior de Agronomia. Nesse local foram plantados um total de 448 tomateiros da cultivar Óptima (Fig. 12a). As plantas foram dispostas em linhas duplas paralelas, separadas por 30 cm (Fig. 12b). Essas plantas foram colocadas na linha com uma distância de 40 cm e de 1m na entrelinha.

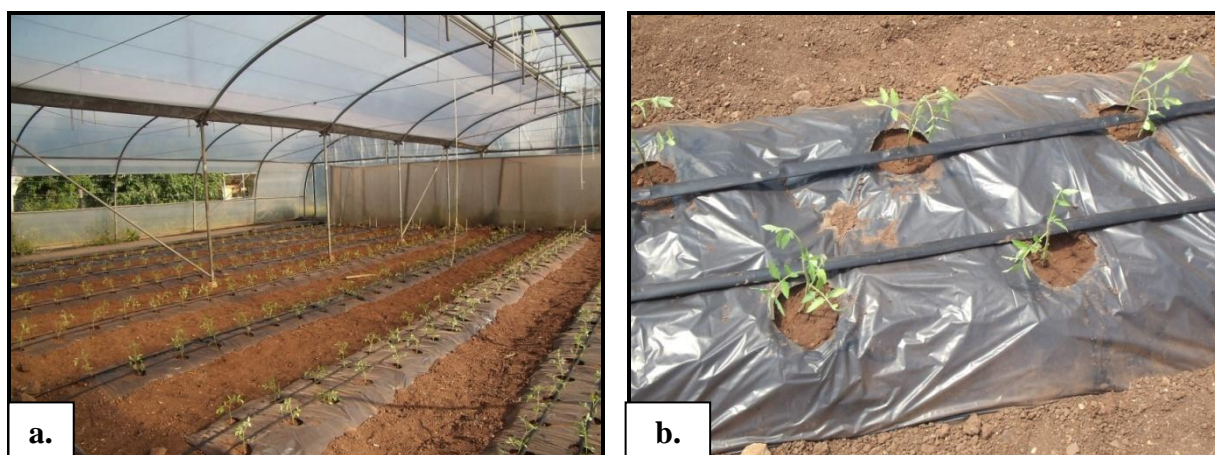


Figura 12 – a. Área da estufa já com a plantação efectuada; b. Pormenor das plantas (Originais de M. Arrizubieta).

Para a manutenção da cultura, durante o tempo necessário para os dois períodos de ensaios (Julho-Agosto e Outubro), foram realizados os trabalhos culturais normais como a monda de infestantes, tutoramento, poda, desfolha, recolha de frutos maduros, e efectuadas duas regas diárias de 5 min (uma de manhã e outra ao fim do dia) com recurso a um programador (Fig. 13a e 13b).

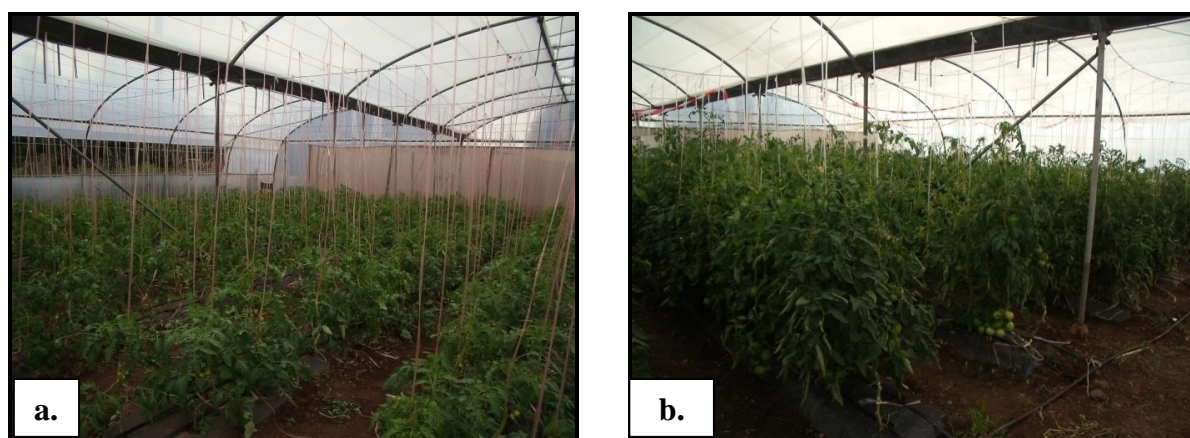


Figura 13 – Cultura de tomate protegido onde se efectuaram os ensaios a. Tutoramento; b. Estado fenológico 4º cacho em floração. (Originais de M. Arrizubieta).

À semelhança do que se faz em estufas comerciais, foi aplicada uma tinta de ensombramento sobre o plástico da estufa com o objectivo de diminuir a temperatura dentro da estufa para não prejudicar o desenvolvimento das plantas.

Quando foi necessário intervir para outros inimigos (e foi necessário efectuar dois tratamentos contra cladosporiose) a escolha dos meios de protecção foi efectuada de modo a reduzir ao máximo o impacto sobre as lagartas-do-tomate com que se iria infestar a cultura. Foi utilizado o fungicida azoxistrobina, pulverizando com o produto comercial Quadris (suspensão aquosa de 250gl⁻¹ s.a.), pois de acordo com Tomlin (2003) e Kay (2007) não afecta o desenvolvimento de *H. armigera*.

5.2. Criação em massa de *Helicoverpa armigera* em laboratório

Para os ensaios de eficácia e persistência foi necessário um total de cerca de 1604 larvas L₂, para cada período de ensaios. A criação destas larvas foi realizada no Insectário do Instituto Superior de Agronomia (Fig. 14a e 14b).



Figura 14 – **a.** Insectário do ISA; **b.** Local de criação dos adultos de *Helicoverpa armigera*. (Originais do autor).

Numa fase inicial foram utilizadas pupas existentes no Insectário do ISA, as quais têm sido mantidas numa estufa a 13°C. Desse material foram retiradas algumas pupas femininas e masculinas que foram colocadas numa câmara de criação a 26°C (HR=80% e fotoperíodo de 14h) para induzir a emergência dos adultos. Foi tido em conta o facto de haver uma diferença de cerca de dois dias entre a emergência das fêmeas e dos machos, pelo que os machos foram retirados da estufa a 13°C dois dias antes das fêmeas.

À medida que os adultos emergiram foram contabilizados o número de fêmeas e machos e colocados em caixa paralelepipedica de acrílico transparente de 30x30x40 cm³ (Fig. 15a e 15b). Essas caixas foram forradas na base e nas paredes com papel de filtro, a fim de facilitar a recolha de ovos. Em cada gaiola foram colocados 1 a 2 bebedouros com esferinhas de vidro e água e açúcar. Colocou-se uma

toalha turca humedecida sobre uma armação que rodeava a caixa, para garantir a humidade necessária para a postura de ovos.

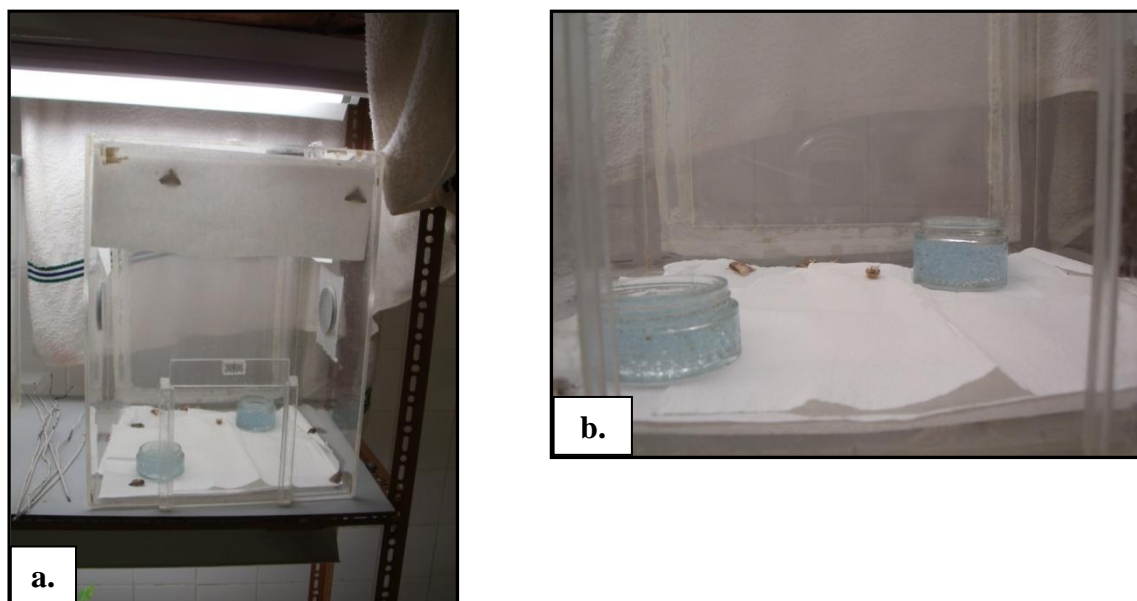


Figura 15 – **a.** Gaiola revestida superiormente com papel vegetal e bebedouros; **b.** Pormenor dos bebedouros (Originais do autor).

Passados cerca de 3-4 dias, as fêmeas começaram a pôr ovos, sobretudo na parte superior das paredes onde foi colocado o papel. É de salientar que apesar dos primeiros ovos serem, maioritariamente, inviáveis, foi efectuada a sua recolha. Diariamente, ou de dois em dois dias, conforme a quantidade de ovos, foram recolhidas as folhas de papel com os ovos e substituídas por novas. Também diariamente mudaram-se os bebedouros, retiraram-se os adultos mortos e humedecia-se a toalha.

Os papéis retirados das caixas foram recortados conforme a disposição dos ovos postos. Os recortes foram colocados em placas rectangulares de cerca de 15 cm de largura e 2 cm de altura, previamente forradas na base, e seladas com Parafilm® (evitando assim a saída das pequenas larvas) (Fig. 16).

À medida que os ovos começam a ganhar o anel castanho (sinal de que o ovo era viável e que se estava a desenvolver bem) era introduzida nas placas uma certa quantidade de dieta artificial preparada em laboratório (ver Anexo II), à base de milho, levedura de cerveja e gérmen de trigo.



Figura 16 - Placa rectangular com ovos recolhidos e dieta artificial, devidamente acondicionadas para serem colocadas em estufa (Original do autor).

Estas placas rectangulares foram mantidas a variadas temperaturas por períodos de tempo diferenciados, entre os 18°C e os 27°C para sincronizar o desenvolvimento das larvas. Devido à necessidade de um número elevado de larvas L₂, foi necessário atrasar o crescimento das primeiras larvas a eclodir e adiantar o desenvolvimento das provenientes das últimas posturas. As larvas que não foram utilizadas nos ensaios foram necessárias para dar continuidade à criação, garantindo assim a 2ª geração requerida para os ensaios seguintes.

À medida que essas larvas foram evoluindo, foram postas 2 a 2 em placas de Petri (Fig. 17a), também previamente forradas na base e colocada dieta. Nesta fase mais avançada, as larvas mostram tendências canibais e, por isso, foi necessário colocar apenas duas larvas por placa de Petri. A dieta era introduzida periodicamente até à pupação, mantendo as condições de baixa humidade nas placas de Petri para tentar minimizar a ocorrência de doenças. Após pupação, as pupas foram separadas por sexo e postas em placas de Petri de vidro, na estufa a 13°C (Fig. 17b).

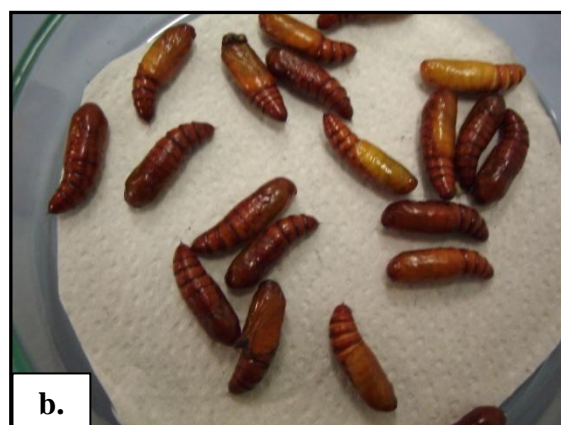


Figura 17 – **a.** Lagartas para obtenção da 2ª geração de *Helicoverpa armigera*; **b.** Pupas para 2ª geração (Originais de M. Arrizubieta).

Repetiram-se os mesmos procedimentos e cuidados na obtenção de lagartas para os segundos ensaios.

5.3. Execução dos ensaios

Os dois ensaios foram realizados em dois períodos diferentes: o primeiro em Julho/Agosto e o segundo no fim de Outubro.

O objectivo inicial seria a realização de quatro repetições/modalidade em cada ensaio (no total oito repetições/tratamento), no entanto, não foi possível fazer quatro repetições no segundo ensaio de eficácia devido a problemas que envolveram a aplicação do baculovírus. Assim realizou-se, para o ensaio de eficácia, 4 repetições para cada tratamento no 1º ensaio e, no 2º ensaio, apenas duas repetições, perfazendo um total de seis repetições/tratamento.

Tendo em conta, a coincidência temporal das actividades relativas aos dois ensaios, achou-se conveniente a realização de um calendário de trabalhos (Quadro 4), com o objectivo de optimização do tempo disponível.

Quadro 4 – Calendário de operações relativas aos ensaios de eficácia e persistência.

Dia	Operação	Ensaio
-1	Infestação artificial.	Eficácia
0	Aplicação de insecticidas.	Eficácia e persistência
1	Início das observações – 24 horas depois das aplicações.	Eficácia
1 a 7	Recolha de folhas de tomateiro para os ensaios de persistência.	Persistência
10	Observações de mortalidade (por excesso) das larvas da infestação artificial e estragos causados pelas larvas sobreviventes.	Eficácia

O ensaio de eficácia começou com o Dia -1, onde se procedeu à infestação artificial da cultura com as larvas (L_2 ou L_{2PM}) criadas no insectário; seguiu-se do Dia 0 com a realização dos diferentes aplicações de insecticidas e da água; e por fim ao 10º dia após a aplicação foram realizadas as observações de mortalidade, por excesso (ou seja, foram contabilizadas as larvas vivas e, através do total de larvas utilizado, encontrado o número de larvas mortas/desaparecidas) e dos estragos causados pelas larvas sobreviventes.

O ensaio de persistência começou, tal como o ensaio de eficácia, no Dia 0, com as aplicações dos insecticidas e depois com a recolha das folhas para os ensaios 24 h após os tratamentos, no Dia 1, de modo a assegurar a absorção dos insecticidas pela folha. Este processo foi repetido diariamente, ao longo de 7 dias.

Delineamento experimental na estufa

A área total da estufa foi dividida em 16 unidades experimentais (subparcelas), usando um delineamento de quadrado latino, o que permitiu a existência de quatro blocos paralelos às janelas da estufa, tendo cada um destes blocos quatro subparcelas (repetições) às quais correspondem tratamentos diferentes. Estes tratamentos foram atribuídos aleatoriamente a cada subparcela e de modo a que estes não se repitam entre linha/coluna, tal como este método experimental obriga. No entanto, para este trabalho apenas foram usados três dos quatros tratamentos. O 4º tratamento, correspondente a uma mistura de três estirpes do baculovírus HaSNPV (1:1:1) com concentração de 10^{13} corpos de oclusão/ha (pH 6,5-7), constitui a parte do trabalho exclusivamente da dissertação de doutoramento da Eng^a. Maíte Arrizubieta Celaya, da Universidade Pública de Navarra, no âmbito do qual este trabalho foi realizado, como descrito na introdução.

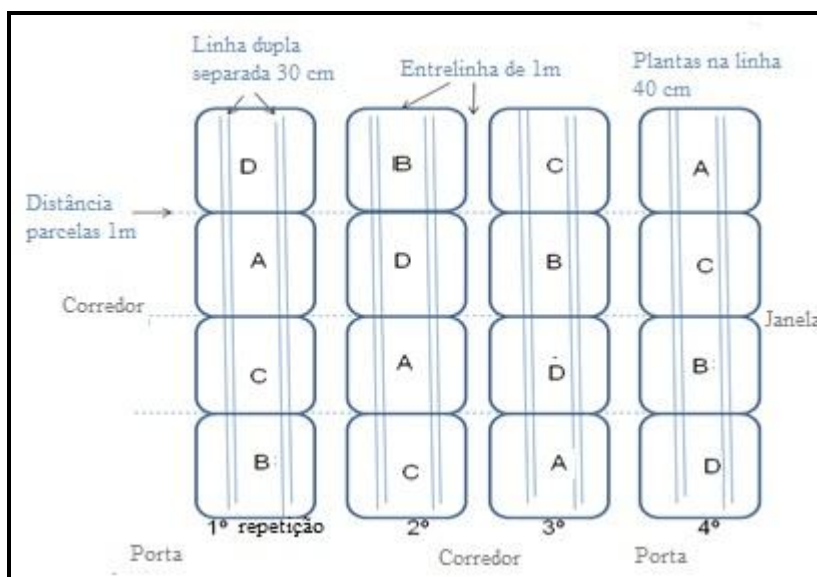


Figura 18 - Esquema do delineamento experimental na estufa (A – spinosade – Spintor susp. conc.480gl⁻¹; B – *Bacillus thuringiensis* – Turex 25000 UI; C – Testemunha - H₂O; D - baculovírus HaSNPV (1:1:1): 10^{13} OBs/ha (pH 6,5-7)) (adaptação, pelo autor, de um desenho de M. Arrizubieta).

Infestação artificial

As larvas a serem utilizadas para a infestação artificial foram individualizadas em pequenas caixas no laboratório e transportadas até à estufa. Esta necessidade deve-se ao facto de, no estado larvar, *Helicoverpa armigera*, mostrar tendências para canibalismo na ausência de alimento, e assim podermos tentar minimizar mortalidades inconvenientes.

Com o auxílio de um pincel e um cuidado extremo, foi colocada uma larva/fruto, sobre a base do pedúnculo (Fig. 19) de maneira a evitar a queda precoce da larva de cima do fruto antes dos tratamentos do dia seguinte.



Figura 19 - Local da deposição das larvas L₂ (Original do autor).

Foram colocados duas larvas, uma em cada fruto, excepto nas seis plantas centrais do interior da subparcela onde foram colocadas 2 larvas por tomate (Fig. 20). Seria mais adequado a colocação de 4 larvas em todas as plantas mas tal não foi possível devido ao número de larvas L₂/L_{2PM} disponíveis para esta infestação artificial. No total, foram colocadas precisamente 1088 (\approx 1100) larvas nas parcelas experimentais em cada período de ensaio. A escolha dos frutos foi aleatória, embora tendo-se tentado assegurar a sua escolha na zona média da planta.

Aplicação dos insecticidas

As marcas comerciais dos insecticidas, escolhidos para estes ensaios, foram Spintor® (suspensão concentrada, s.a. spinosade, mistura de spinosinas A e D, com 44,2% de substância activa, 480gl⁻¹) (Lusosem, s/data) e Turex (pó molhável de conjugado de *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* x *aizawai* 25.000 Unidades Internacionais (UI) face a *Trichoplusia ni*, correspondendo a 3,8%) (Biosani, s/data) sendo que para a Testemunha se utilizou apenas água. De acordo com a informação contida no rótulo, Turex® deve ser aplicado numa dose de 1kg/ha, em aplicações de alto volume (1000L/ha), ou seja, 100g/100L de calda. Para a lagarta-do-tomate, a concentração aconselhada de Spintor®. é de 20-25ml/hl ou a dose de 200-250ml/ha. Em relação às características de formulação, frases de risco e classificação toxicológica, de Turex® e Spintor®, estes podem ser consultados no Quadro 1 do Anexo 1 deste trabalho.

Fecharam-se as janelas da estufa de forma a diminuir o “drift”. Foi aplicado 1L de água por subparcela, tendo-se realizado 4 L de calda e pulverizado as 4 subparcelas de cada tratamento, ou seja, usou-se 1 ml de Spintor®, 4 g de Turex®. A aplicação dos insecticidas foi efectuada em 17-07-2011 e 10-10-2011 pela ordem seguinte: Testemunha, Spintor, Turex e baculovírus, com um pulverizador de dorso de jacto projectado com capacidade de 5L. Para a preparação da calda foram seguidas as normas adequadas. Usou-se água da rede pública (EPAL). Antes e entre as aplicações, o pulverizador foi

previamente lavado (interior, tubo e bico) para reduzir o risco da existência de resíduos da aplicação anterior.

Dado que *B. thuringiensis* possui uma meia-vida curta e é muito sensível à luz, como foi referido atrás, as aplicações de insecticida foram efectuadas ao fim da tarde, para minimizar a sua exposição à luz.

Procedimentos exclusivos do ensaio de eficácia

Ao 10º dia após a pulverização dos insecticidas observaram-se as seis plantas centrais de cada repetição e modalidade, para avaliar os estragos e a mortalidade das larvas com que se infestou artificialmente a cultura.

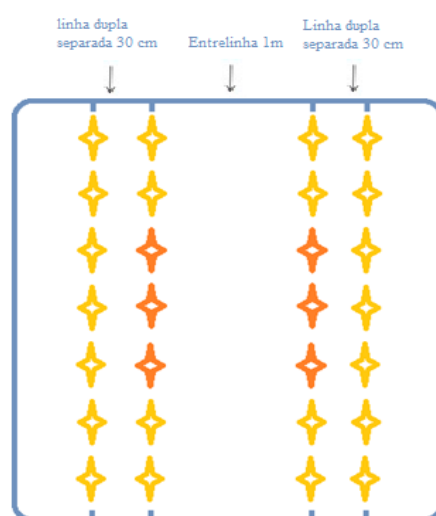


Figura 20 - Esquema da disposição das larvas em cada subparcela correspondente a cada repetição/tratamento (Original do autor). Legenda: 🍅 Plantas a amarelo: 2 tomates/planta - 1 larva/tomate; 🍅 Plantas a laranja: 2 tomates/planta - 2 larvas/tomate.

Procedimentos exclusivos do ensaio de persistência

A parte laboratorial dos ensaios de persistência foi executada no Lab. de Ensaio Biológico do Instituto Superior de Agronomia (Fig. 21).



Figura 21 – Laboratório onde se realizaram os ensaios de persistência (Original do autor).

Para cada modalidade e repetição foram aleatoriamente colhidas folhas previamente tratadas como referido anteriormente e colocadas em sacos devidamente identificados (Fig. 22).



Figura 22 - Folhas que foram recolhidas aleatoriamente e devidamente separadas em sacos identificados (Original do autor).

Em laboratório, realizaram-se quatro repetições para cada tratamento, em que cada repetição consistiu em colocar, numa placa de Petri, 1-2 das folhas recolhidas juntamente com 7 larvas em L₂ (ou pré-muda). Para a Testemunha apenas foi possível utilizar em cada repetição 4 larvas (Fig. 23).

Num total foram utilizadas 28 larvas para cada tratamento e 16 larvas para a Testemunha. Para a deslocação das larvas usaram-se pinceis diferentes para as repetições de cada tratamento, para tentar evitar qualquer tipo de contaminação. Estes pinceis foram marcados para cada modalidade, cuidadosamente lavados com etanol e hipoclorito de sódio e colocados em estufa a 120°C durante 24h, diariamente. As placas foram colocadas numa câmara de criação a 24°C, cerca de 70% HR e 14h de fotoperíodo.

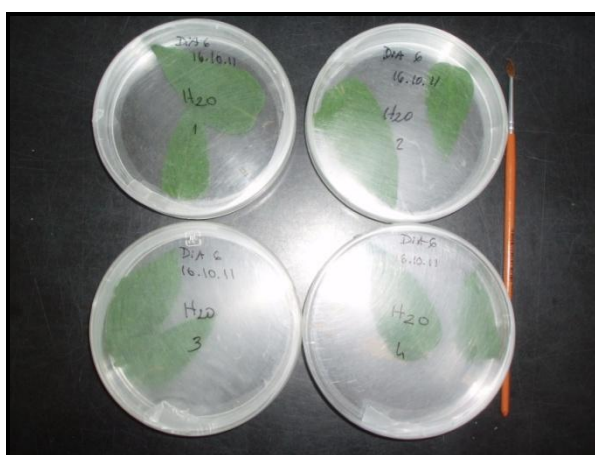


Figura 23 - Ensaio de persistência do dia 6 para a testemunha (Original do autor).

Passados dois dias (48h) observou-se a mortalidade em cada repetição/modalidade. As larvas sobreviventes foram individualmente colocadas em placas quadriculadas (Fig. 24a e 24b) com cerca de 2,45cm³ de dieta artificial à base de milho. As placas foram devidamente seladas e mantidas nas condições anteriormente referidas.

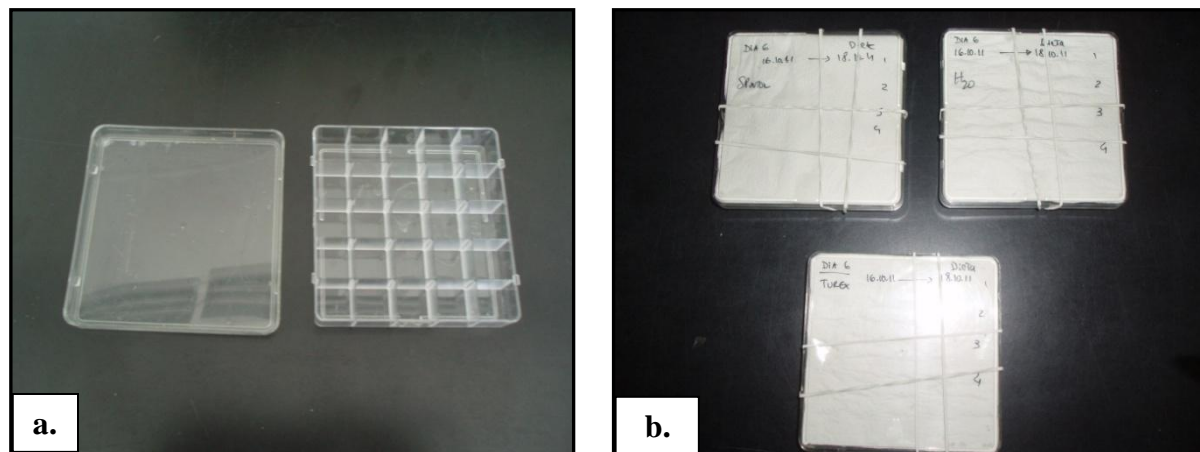


Figura 24 – a. Placa de plástico quadriculada; **b.** Placas devidamente seladas, já com dieta e as larvas sobreviventes ao final das primeiras 48 horas (Originais do autor).

Passados cinco dias observou-se novamente a mortalidade. Nesta altura, as larvas vivas foram postas em sacos e congeladas para serem removidas para o lixo.

Este procedimento foi realizado diariamente, durante 7 dias consecutivos após o Dia Zero. Para cada ensaio de persistência foram precisas diariamente 72 larvas em L₂, num total de 504 larvas ao longo dos 7 dias.

Tratamento estatístico dos dados

Foi utilizada a Fórmula de Abbott para corrigir os resultados referentes à mortalidade, tanto dos ensaios de persistência, como dos ensaios de eficácia. Esta fórmula é normalmente utilizada para corrigir a mortalidade retirando a mortalidade natural a cada uma das modalidades tratamento.

No 2º ensaio de persistência observou-se em duas repetições da testemunha uma elevada mortalidade, com razões desconhecidas, pelo que se retirou para cada dia do ensaio, as duas repetições que obtiveram as maiores mortalidades médias observadas, do total das quatro efectuadas na testemunha. Para a mortalidade da testemunha (Pc), na Fórmula de Abbott, foram utilizadas as médias entre as duas repetições restantes na testemunha, para cada dia do ensaio. Pensa-se que a elevada mortalidade observada nas duas repetições possa estar relacionadas com a proximidade de folhas das parcelas Testemunha com plantas onde se tenham efectuado tratamentos. No entanto, como a recolha das

folhas é aleatória, não se sabe ao certo qual a parcela que tenha ocorrido esse problema, daí ter-se retirado duas repetições da testemunha para os dias do ensaio.

Apesar de existirem testes estatísticos próprios para a análise de sobrevivência (por exemplo, distribuição de Weibull, teste de Kaplan-Meier) e modelos para estudos de persistência, optou-se por uma análise de dados mais preliminar dado as incongruências observadas nos dados. Para o ensaio de persistência, os dados foram tratados através de análise de variância não-paramétrica, teste de Kruskal-Wallis, pois os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variância não foram cumpridos, mesmo após transformação dos dados. Para analisar os dados correspondentes aos estragos e mortalidade do ensaio de eficácia, foram efectuados testes não-paramétricos de Friedman. A análise estatística foi efectuada recorrendo ao programa SPSS Standard Data (v. 17,0).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Ensaio de eficácia

Nas seis plantas centrais de cada parcela observadas em cada tratamento, a maior mortalidade observou-se nas parcelas de spinosade com 97,7% das larvas mortas, seguido das parcelas tratadas com *B. thuringiensis* com 91,7%, resultados que não são estatisticamente diferentes (Fig. 25).

Gosh *et al.* (2010) observaram, embora para um período mais curto de 7 dias, que as mortalidades correspondentes às aplicações de spinosade foram de 78,4%, 88,6% e 100% para aplicações de 45, 56 e 73-84 g/ha s.a.. Neste ensaio, o valor encontrado para spinosade é semelhante aos verificados por Gosh *et al.* (2010), embora se tenha observado mortalidades equivalentes às mais elevadas com dose semelhante à mais baixa usada por estes autores.

A mortalidade obtida nas parcelas tratadas com *B. thuringiensis* é muito superior ao observado por Kroschel *et al.* (1995) e Arthurs *et al.* (2008) na batata, onde o primeiro observou uma mortalidade de 41-54% em folhas e 10-23% em tubérculos à colheita e o segundo autor observou 36-76% em tubérculos.

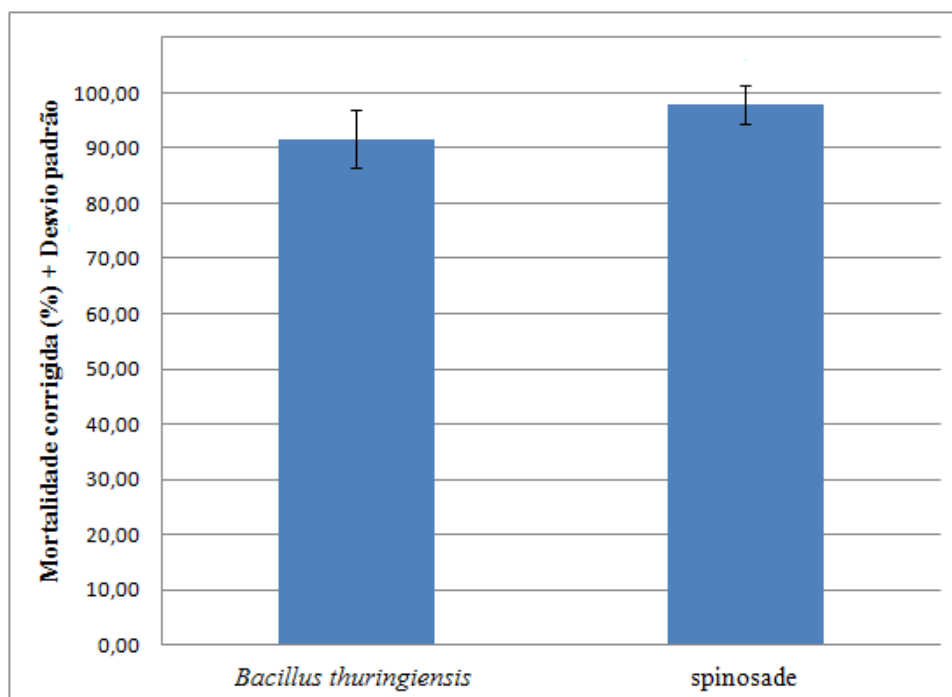


Figura 25- Resultados do Ensaio de Eficácia relativos à mortalidade corrigida de *Helicoverpa armigera* causada por Turex (*Bacillus thuringiensis*) e Spintor (s.a. spinosade) (ver Anexo III – Quadro 4; Anexo IV – Quadro 8; Anexo V – Quadro 11 e 12) (N=6).

No entanto, e embora as eficácias de *B. thuringiensis* e spinosade tenham sido semelhantes, os estragos observados nessas parcelas foram significativamente diferentes. Foi com spinosade que se obteve menor percentagem de estragos com 13,6%, com *B. thuringiensis* obteve-se 15,8% e, por

último, na testemunha observaram-se 27,7% de estragos provocados pelas larvas com que se infestou previamente a estufa (Fig. 26). Embora não se tenha obtido diferenças significativas na mortalidade, verificaram-se diferenças no que se refere aos estragos. Uma larva de *H. armigera* pode provocar estragos em até 5 frutos, pelo que a diferença em uma única larva que seja pode fazer toda a diferença na quantidade de estragos total. Neste ensaio, embora a diferença de larvas mortas (6,25%) não seja um valor significativo, foi o suficiente para provocar uma diferença de 2,23% de estragos, o que a nível comercial pode fazer diferença.

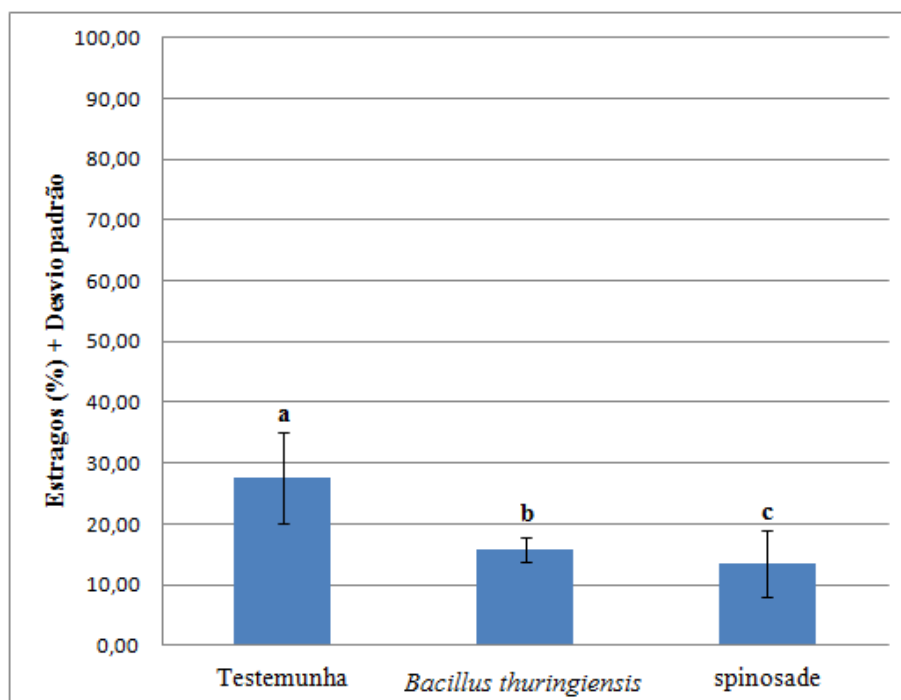


Figura 26 - Resultados do Ensaio de Eficácia relativos aos estragos causados por *Helicoverpa armigera*, em parcelas tratadas com água (Testemunha), Turex (*Bacillus thuringiensis*) e Spintor (s.a. spinosade) (ver também Anexo III – Quadro 3; Anexo IV – Quadro 7; Anexo V – Quadro 11 e 12) (N=6).

Gosh *et al.* (2010) também verificaram, na cultura do tomate, que as parcelas experimentais de spinosade foram também as que sofreram menos estragos: 2,1-2,4%, 10,6% e 22,8% de frutos atacados para as concentrações de spinosade atrás descritas. O valor encontrado neste trabalho situou-se neste intervalo de valores, com cerca de 13,6% de frutos atacados, com uma dose de spinosade de 48 g/ha s.a. como referido anteriormente.

Mandaokar *et al.* (2000) observaram os estragos em tomate transgénico com expressão de Cry1Ac e verificaram que os estragos variam entre 2% e 4,54%, enquanto plantas não transgénicas (Testemunha) sofreram estragos de 48%. Neste trabalho verificaram-se estragos de 15,8% nas parcelas tratadas com *B. thuringiensis* e testemunha de 27,7%. Quando comparado aos do autor anterior podemos verificar que plantas transgénicas apresentam maior eficácia pois os estragos sofridos foram

menores que os do nosso ensaio, embora a nossa testemunha sofreu cerca de menos 20,3% de estragos. No entanto esta comparação é relativa pois as condições de plantação foram diferentes, sendo o ensaio deste autor realizado ao ar livre e este em estufa.

6.2. Ensaio de persistência

No primeiro ensaio (Fig. 27), a média da mortalidade corrigida para spinosade ao longo do período de observação situou-se entre 85,7% e 100,0%, enquanto no caso de *B. thuringiensis* se obteve mortalidades que decresceram de 58,3% para 41,7%, existindo uma diferença significativa na mortalidade induzida pelos dois tratamentos em todos os dias testados. A mortalidade causada por spinosade não mostrou nenhuma tendência de variação ao longo dos 5 dias do ensaio, apenas oscilou num intervalo de valores mais ou menos constantes. A mortalidade induzida por *B. thuringiensis* manteve-se mais ou menos constante até ao 3º dia e só depois daí ao 5º dia sofreu uma ligeira diminuição (58,3%, 56,3% e 41,7%).

A mortalidade inicial provocada por *B. thuringiensis* é cerca de 27% mais baixa que a de spinosade, chegando esta diferença de mortalidades a ser de quase 45% ao 5º dia.

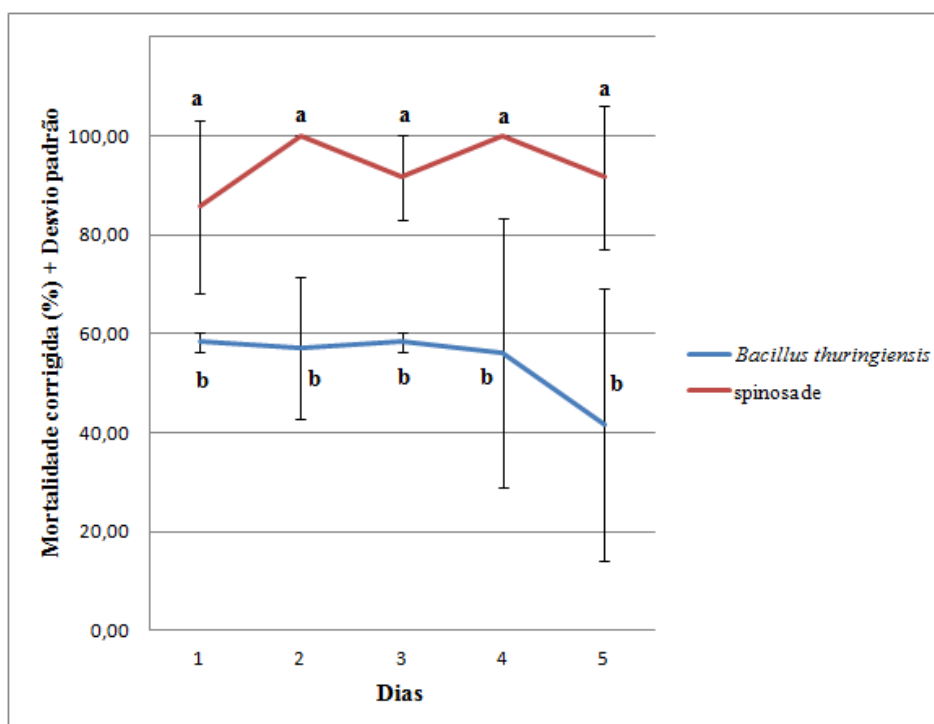


Figura 27 – Resultados do 1º Ensaio de persistência correspondentes à mortalidade corrigida de *Helicoverpa armigera* induzida por Turex (*Bacillus thuringiensis*) e Spintor (s.a. spinosade) (ver Anexo III – Quadro 5; Anexo IV – Quadro 9; Anexo V – Quadro 13III e 14IV) (N=4).

No segundo ensaio (Fig. 28), o spinosade provocou sempre mortalidades corrigidas muito elevadas (100%), ou seja, apresentou elevada persistência ao longo dos primeiros 4 dias do ensaio, decrescendo no 6º dia para 85,7% e no último dia para 93,8%. Nos ensaios com *B. thuringiensis*, observou-se uma mortalidade corrigida média crescente do 1º ao 5º dia (66,7% a 100%), tendo-se obtido o valor mais baixo ao 6º dia (42,9%); no entanto, a mortalidade observada aumentou novamente no 7º dia para 68,8%, tal como na modalidade spinosade.

Como no primeiro ensaio, também neste se verificam diferenças significativas na mortalidade causada pelas duas substâncias activas durante todos os dias (à excepção do 4º dia), neste caso de cerca de 35%, embora os valores de mortalidade obtidos para *B. thuringiensis* tenham sido mais elevados do que os do primeiro ensaio.

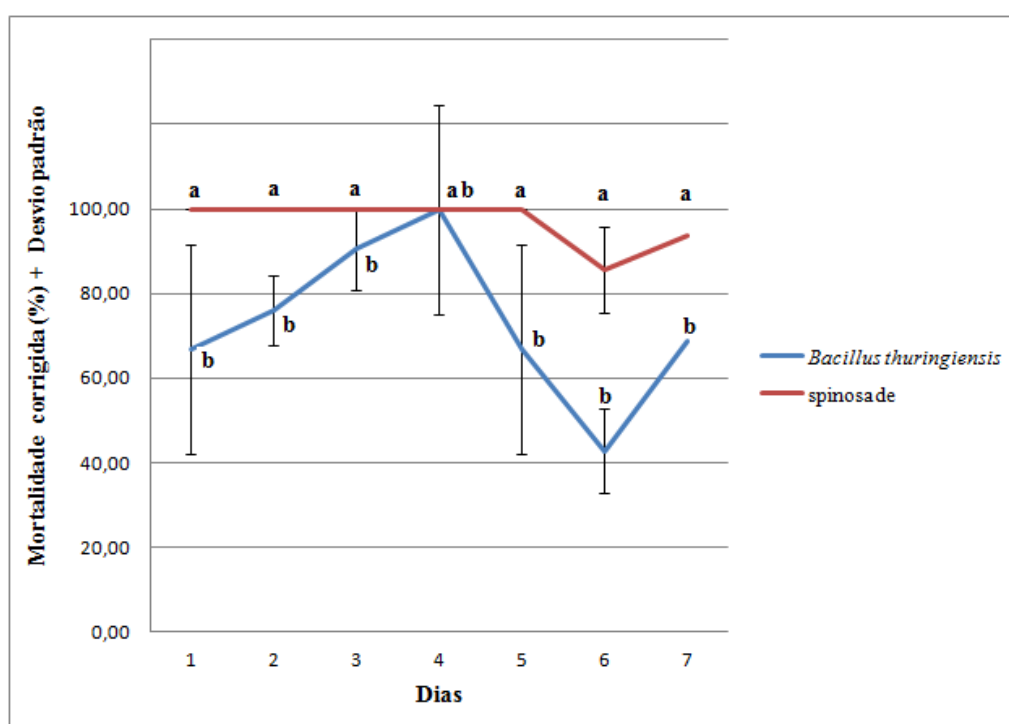


Figura 28 - Resultados do 2º Ensaio de persistência correspondentes à mortalidade corrigida de *Helicoverpa armigera* induzida por Turex (*Bacillus thuringiensis*) e Spintor (s.a. spinosade) (ver Anexo III – Quadro 6; Anexo IV – Quadro 10; Anexo V – Quadro 13 e 15) (N=4).

Seria expectável observar valores de mortalidade decrescentes ao longo do período do ensaio, no entanto, tal não se verificou com *B. thuringiensis*, no segundo ensaio. Pelo contrário, a mortalidade foi crescente neste caso, apesar de se ter observado uma diminuição entre o 4º e 6º dia. Esta tendência anormal de evolução da mortalidade, e por consequência, da persistência, pode ser fruto de diversos factores relacionados com o trabalho efectuado. A primeira causa a que parece estar associada esta mortalidade anormal é a de terem ocorrido contaminações. As folhas recolhidas das subparcelas de *B. thuringiensis* poderiam estar muito próximas das subparcelas tratadas com spinosade, uma vez que

nesta fase as plantas já possuíam um elevado porte e encontravam-se em contacto com outras plantas. Uma segunda causa pode estar ligada à transpiração das folhas recolhidas dentro das placas de Petri, o que pode ter criado condições de humidade que possam ter induzido maiores mortalidades. Outro factor pode estar relacionado com a zona da planta em que as folhas foram recolhidas. Embora tenha existido o cuidado de se recolher à mesma altura da planta, pode ter acontecido que estas tenham sido recolhidas de zonas diferentes e que a quantidade de radiação solar tenha variado, e por isso também a mortalidade observada. Não esquecer também que na mesma população de *H. armigera* existe variabilidade interpopulacional o que pode fazer variar a resposta das diferentes larvas à actividade dos insecticidas. Neste tipo de trabalhos deverá ter-se em conta o “drift” que pode ocorrer na pulverização e tentar ao máximo a realização de uma boa manutenção quer na estufa, quer em laboratório no manuseamento das larvas. De realçar também o facto de estes ensaios terem sido efectuados com um número muito reduzido de larvas e nestas circunstâncias ser muito provável a existência de variâncias muito elevadas e menor precisão dos resultados.

Durante o período de 7 dias dos ensaios de persistência, spinosade na formulação Spintor causou entre 85,7% e 100,0% de mortalidade em larvas de *H. armigera*. Para *B. thuringiensis*, formulado no produto comercial Turex, DT₅₀ foi obtido aproximadamente aos 4,5 dias e 5,5 dias, no 1º e 2º ensaios, respectivamente. Ao final do 5º dia (1º ensaio) e do 7º dia (2º ensaio), no caso de spinosade, a mortalidade não tinha descido abaixo dos 90%. Assim, de uma forma muito preliminar aponta-se para uma persistência de 5 dias para o produto formulado Turex, não se podendo definir a persistência para Spintor.

Não se encontraram, na bibliografia, trabalhos de avaliação de persistência em tomate protegido quer para *B. thuringiensis* quer para spinosade, pelo que é difícil efectuar comparações. Contudo, valores semelhantes de mortalidade de spinosade foram observados por Liu *et al.* (1999) em larvas de *T. ni* (85% - 100%) e por Brévault *et al.* (2009) para *H. armigera* (95 – 100%), embora num período de 12 dias e 14 dias, respectivamente. No entanto, Duffield *et al.* (2000) observaram uma menor persistência de spinosade, em soja, à qual correspondeu um decréscimo da mortalidade de 100% para 40% em larvas de *H. armigera* em 7 dias. Persistência mais elevada de spinosade foi observada por Daglish *et al.* (2008) em trigo armazenado, onde se observou 100% de mortalidade em *R. dominica* durante 14 dias consecutivos.

Neste trabalho, verificou-se a elevada persistência de spinosade, com mortalidades induzidas superiores a 90% num período de 7 dias. No entanto, outros autores observaram períodos mais longos: 14 dias (Brévault *et al.*, 2009; Daglish *et al.*, 2008) e 25 dias (El Santi *et al.*, 2011).

Relativamente ao tratamento com *B. thuringiensis*, verificou-se que a mortalidade das larvas decresceu de 58,3% para 41,7% no primeiro ensaio e oscilou entre 41,7% e 100,0% no segundo ensaio.

Babu *et al.* (2002) observaram uma mortalidade acumulada de 50%, a qual foi observada a maior parte no 1º dia, enquanto Mensah *et al.* (2007) observaram em algodão o decréscimo de 70% para 16% em 7

dias, com uma mortalidade média de 31,5%. Para a vinha, Bailey *et al.* (1996) observaram que a mortalidade de *B. thuringiensis* diminui de 80% para 20%, na presença de luz, e para 60%, com ausência de luz.

Tal como Bailey *et al.* (1996) verificaram, o factor luz pode provocar diferenças significativas na acção dos insecticidas. A fotodegradação desempenha um papel fundamental na meia-vida e na persistência da maioria das substâncias activas e, neste caso em especial, na persistência de *B. thuringiensis*, o qual é muito sensível à luz UV como descrito no Cap. 3. Deste modo, e para além de outros factores biológicos e químicos adjacentes à natureza do insecto e das substâncias activas utilizadas, a influência da luz ultravioleta poderá explicar as diferenças observadas entre as mortalidades induzidas de *B. thuringiensis* e spinosade e até mesmo entre os dois ensaios.

Sendo a inativação de *B. thuringiensis* mais sensível à exposição solar, do que spinosade, tal pode explicar as diferenças significativas entre as mortalidades observadas com estes dois insecticidas.

A persistência mais elevada no segundo ensaio e, consequentemente, a maior mortalidade quando comparada com o primeiro ensaio, poderá ser explicado pelo facto de esse ensaio ter sido realizado em Outubro onde os dias são ligeiramente mais curtos e, por isso, haver menos horas de luz, ao passo que o segundo ensaio foi realizado em pleno Verão (Julho/Agosto).

Não se pode esquecer também de que o ensaio foi realizado com plantas criadas em estufa, factor que por um lado disponibiliza menos luz do que em culturas ao ar livre e, por outro lado, porque ao pintar o plástico da estufa também se diminuiu a luz transmitida para o seu interior. Quando se compara com outros estudos realizados por diferentes autores deve ter-se em conta as condições em que foram feitos os ensaios (Estufa vs. Ar livre), como se verificou com os autores descritos anteriormente.

Salienta-se novamente que o número de larvas de *H. armigera* utilizado foi relativamente baixo para ter segurança nos resultados obtidos. No entanto, com as condições, equipamento e número de intervenientes disponíveis para a realização deste trabalho foi impossível criar uma população mais elevada, pois a criação de *H. armigera* em laboratório é morosa e requeria maior disponibilidade de câmaras de criação reguladas a temperaturas diferenciadas para obter maior número de larvas no mesmo estado de desenvolvimento.

7. CONCLUSÃO

Não se verificaram diferenças de eficácia entre *Bacillus thuringiensis* e spinosade, usando os produtos formulados Turex e Spintor, respectivamente. Contudo, os estragos causados por *Helicoverpa armigera* foram mais elevados com Turex do que com Spintor.

Relativamente à persistência verificou-se elevada mortalidade induzida por spinosade durante, pelo menos, sete dias. Já *B. thuringiensis* demonstrou uma maior variação na mortalidade induzida, sobretudo no 2º ensaio.

Mesmo não tendo sido objecto de estudo neste trabalho, pensa-se que a luz UV tenha tido grande influência na actividade dos insecticidas (tal como verificamos na revisão bibliográfica), reflectindo-se estas diferenças nos resultados, sobretudo, dos ensaios de persistência.

Mesmo com os valores anormais verificados, os resultados para ambos os tratamentos foram satisfatórios e permitem aconselhar ao agricultor a sua utilização numa situação real. São dois insecticidas com elevado potencial para uso na cultura do tomate, no combate a *H. armigera*. No entanto, não se deve esquecer a importância da sua utilização em alternância, tal como a Protecção Integrada aconselha, sobretudo pelo facto de tentar evitar o desenvolvimento de novos mecanismos de resistências por parte de pragas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, M.; ARIF, M. & AHMAD, Z. Susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to new chemistries in Pakistan. *Crop Protection*, **22** (3): 539-544 (2003).

AMARO, P. *A Protecção Integrada*, Projecto Agro 12, ISA/Press, Lisboa, 446 p. (2003).

AMARO, P. *A política de redução dos riscos dos pesticidas em Portugal*. Projecto Agro 545, ISA/Press, Lisboa, 167 p. (2007).

AMARO, F. & MEXIA, A. Cálculos de prejuízo causados pela lagarta do tomate *in* AMARO, F. & MEXIA, A. *Protecção integrada em tomate de Indústria*. Projecto Pro Agro 189, Instituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas, 114 p. (2006).

ANGELO, E.; VILAS-BOAS, G. & CASTRO-GOMÉZ, R. *Bacillus thuringiensis*: Características gerais e fermentação. *Semina Ciências Agrárias, Londrina*, **31** (4): 945-958 (2010).

ANÓNIMO. *Bacillus thuringiensis*. Pesticide Information Project of Cooperative Extension Offices of Cornell University, Michigan State University, Oregon State University and University of California at Davis. USDA/Extension Service/National Agricultural Pesticide Impact Assessment Program Acedido a 12-11-2011, *in*: <http://pmep.cce.cornell.edu/> (Maio, 1994).

ARAÚJO, A. C. Luta biológica contra *Heliothis armigera* no ecossistema agrícola “tomate de indústria”. Dissertação para o Grau de Doutor em Entomologia, Universidade de Évora, Évora (1990).

ARGAWAL, R.; CHOUDHARY, A.; TRIPATHI, N.; PATIL, S.; AGNIHOTRIS, S. & DEEPAK, B. Biopesticidal formulation of *Metarhizium anisopliae* effective against larvae of *Helicoverpa armigera*. *International Journal of Agricultural and Food Science*, **2** (2): 32-36 (2012).

ARONSON, A. & SHAI, Y. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. *FEMS Microbiology Letters*, **195**: 1-8 (2001).

ARTHURS, S.; LACEY, L.; PRUNEDA, J. & RONDON, S. Semi-field evaluation of granulovirus and *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* for season-long control of potato tuber moth, *Phthorimaea operculella*. *Microbial control of potato tuber moth in the field*: 276-285 (2008).

ÁVILLA, C.; VARGAS-OSUNA, E.; GONZÁLEZ-CABRERA, J.; FERRÉ, J. & GONZÁLEZ-ZAMORA, J. Toxicity of several delta-endotoxins of *Bacillus thuringiensis* against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from Spain. *Journal of Invertebrate Pathology*, **90**: 51-54 (2005).

BABU, B.; UDAYASURIYAN, V.; MARIAM, M.; SIVAKUMAR, N.; BHARATHI, M. & BALASUBRAMANIAN, G. Comparative toxicity of Cry1Ac e Cry2Aa delta-endotoxins of *Bacillus thuringiensis* against *Helicoverpa armigera* (H.). *Crop Protection*, **21**: 817-822 (2002).

BAILEY, P.; BAKER, G. & CAON, G. Field efficacy and persistence of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* against *Epiphyas postvittana* (Walker) (Lepidoptera: Tortricidae) in relation to larval behavior on grapevine leaves. *Australian Journal of Entomology*, **35**: 297-302 (1996).

BAYER CROP SCIENCE. Acedido a 01-12-2011 *in*:

http://www.bayercropscience.co.za/crops/Wheat/Wheat_bollworm.aspx (s/data).

BIOBEST. Acedido a 20-01-2012 *in*: <http://www.biobest.be/neveneffecten/3/3/> (s/data).

BIOSANI. *Ficheiro Técnico Turex*. Acedido a 01-08-2012 *in*: <http://proteccaointegrada.biosani.com/> (s/ data).

BIRD, L. & AKHURST, R. Variation in susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Hbn) and *Helicoverpa punctigera* (Wallengren) (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia to two *Bacillus thuringiensis* toxins. *Journal of Invertebrate Pathology*, **94**: 84-94 (2007).

BRAVO, A.; GILL, S. & SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, **49** (4): 423-435 (2007).

BRAVO, A.; LIKITVIVATANAVONG, S.; GILL, S. & SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis*: A story of successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **41**: 423-431 (2011).

BRAVO, A. & SOBERÓN, M. How to cope with insect resistance to Bt toxins? *Trends in Biotechnology*, **26** (10): 573-579 (2008).

BRÉVAULT, T.; OUMAROU, Y.; ACHALEKE, J.; VAISSAYRE, M. & NIBOUCHE, S. Initial activity and persistence of insecticides for the control of bollworms (Lepidoptera: Noctuidae) in cotton crops. *Crop Protection*, **28** (5): 401-406 (2009).

CABI & OEPP/EPPO. Data Sheets on Quarantine Pests nº 110, *Helicoverpa armigera* Bulletin OEPP/EPPO: 159-164 (1992).

CHAKRABARTI, S.; MANDAKAR, A.; KUMAR, P. & SHARMA, R. Efficacy of lepidopteran-specific delta-endotoxins of *Bacillus thuringiensis* against *Helicoverpa armigera*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **72**: 336-337 (1998).

CHENG, A. Acedido a 01-12-2011 *in*:

[http://www.alibaba.com/product-free/10876859/HaNPV_Helicoverpa_Armigera_NPV_\(s/data\)](http://www.alibaba.com/product-free/10876859/HaNPV_Helicoverpa_Armigera_NPV_(s/data)).

CIBA. Agree/Turex (*Bacillus thuringiensis* GC-91): a biological product for the control of harmful caterpillars in grapes, vegetables and field crops. Technical product information PP 7.315. *Biological and natural products*, CIBA Basel – Plant Protection Division, Basel, 29 p. (1993) (*cit. in* Frescata, 2004).

CORTES, A. J. Relatório da actividade do aluno estagiário do curso de Eng. Agrónomo, ISA/UTL, Lisboa (1972).

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, R.; FEITELSON, E.; SCHENPF, J.; RIE, D.; LERECLUS, J.; BAUM, J. & DEAN, H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **62** (3): 807-813 (1998).

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BRAUM, J.; BRAVO, A. & DEAN D. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature (2010) (*cit. in* Bravo *et al.* 2011).

DAGLISH, G.; HEAD, M. & HUGHES, P. Field evaluation of spinosad as a grain protectant for store wheat in Australia: efficacy against *Rhizopertha dominica* (F.) and fate of residues in whole wheat and milling fractions. *Australian Journal of Entomology*, **47**: 70-74 (2008).

DANIEL, W. *Applied nonparametric statistics*. Houghton Mifflin Comp., Boston, 510 p. (1978).

DELAPLANE, K. *Pesticides usage in the United States: History, Benefits, Risks and Trends*. Cooperative Extension Service, The University of Georgia, Athens, Georgia (1996).

DGADR – Direcção Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural. *Actualização dos produtos fitofarmacêuticos aconselhados em Protecção Integrada*. Ministério da Agricultura, do desenvolvimento Rural e das Pescas, Lisboa, 33 p. (2011) (<http://www.dgadr.pt/>).

DGADR – Direcção Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural. *Guia dos produtos Fitofarmacêuticos. Lista de produtos com venda autorizada*. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, Lisboa, 222 p. (2012). (<http://www.dgadr.pt/>).

DIAS, R. *Limitação natural de Helicoverpa armigera (Hbn) em tomate de indústria no Ribatejo: parasitoides e predadores*. Relatório de Trabalho Fim Curso em Eng. Agronómica, ISA, Lisboa, 70 p. (2005).

DOWAGROSCIENCE. Material Fact Sheet Spinosad. *Organic Resource Guide*, 140 – 146 (2001a).

DOWAGROSCIENCE. *Spinosad Technical Bulletin*. DowAgroscience, Indianapolis, 18 p. (2001b).

DUCEPT, S. 6 Pattes, les papillons de la Vienne. Acedido a 14-04-2012 *in*: <http://www.6pattes.fr/index.php?page=Helicoverpa-armigera> (2012, 8 Março).

DUFFIELD, S. & JORDAN, S. Evaluation of insecticides for the control of *Helicoverpa armigera* (Hbn) and *Helicoverpa punctigera* (Wallengren) (Lepidoptera: Noctuiade) on soybean and the implications for field adoption. *Australian Journal of Entomology*, **39**: 322-237 (2000).

DUPONDTM. Rynaxypyr® insecticida *Boletín Técnico*. E.I. du Pont de Nemours and Company, 12p. (2007).

EFSA – European Food Safety Authority. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance lufenuron. *EFSA Scientific report*, **189**: 1-130 (2008).

EFSA – European Food Safety Authority. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance chlorpyrifos. *EFSA Journal*, **9** (1):1961[14 p.] (2011a).

EFSA – European Food Safety Authority. Scientific support for preparing an EU position in the 44th Session of the Codex Committee on Pesticide Residues (CCPR). *EFSA Journal*, **9** (9): 2360 [123 p.] (2011b).

EFSA – European Food Safety Authority. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (strains ABTS 351, PB 54, SA 11, SA 12, EG 2348). *EFSA Journal*, **10** (2): 2540 [66 p.] (2012a).

EFSA – European Food Safety Authority. Scientific support for preparing an EU position in the 44th Session of the Codex Committee on Pesticide Residues (CCPR). *EFSA Journal*, **10** (7): 2859 [155 p.] (2012b).

EPA – Environmental Protection Agency. *Reregistration Eligibility Decision (RED): Bacillus thuringiensis (EPA-738-R-98)*; U.S. Environmental Protection Agency, Office of Pesticides Program, U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 170 p. (1998).

EPA – Environmental Protection Agency. *Reregistration Eligibility Science chapter for Chlorpyrifos – Fate and environmental risk assessment chapter*. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 94 p. (1999).

EPA – Environmental Protection Agency. *Pesticide Fact Sheet – Chlorantraniliprole (Unconditional Registration)*. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 77 p. (2008).

EPA – Environmental Protection Agency. *Spinosad and spinetoram summary document registration review: Inicial Docket*, USA, Setembro, 21 p. (2011).

ESTELA, A.; ESCRICHE, B. & FERRÉ, J. Interaction of *Bacillus thuringiensis* toxins with larval midgut bindings sites of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Applied and Environmental Microbiology*, **70** (3): 1378-1383 (2004).

EUROSTAT. Acedido a 17-12-2011 *in*:
<http://epp.eurostat.ec.europa.eu/portal/page/portal/eurostat/home/> (2011).

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO specifications and evaluations for Lufenuron. *FAO Specifications and evaluations of agricultural pesticides*, 21 p. (2007).

FAUNA EUROPAEA. Acedido a 21-02-2012 *in*: http://www.faunaeur.org/full_results.php?id=449072 (2011, 27 Janeiro).

FERRÉ, J. & RIE, J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology*, **47**: 501-533 (2002).

FERREIRA, M. R. *Cinética do desenvolvimento de Heliothis armigera*. Trabalho Fim de curso de Eng. Agrícola, Universidade de Évora, Évora, 75 p. (1989).

FIGUEIREDO, E. *Entomopatogénicos e bio-pesticidas*. Provas de aptidão pedagógica e capacidade científica, ISA/UTL, Lisboa, 355 p. (1997).

FIGUEIREDO, E. *Noctuídeos em culturas hortícolas – contribuição para a protecção integrada*. Tese de Doutoramento em Eng. Agronómica, ISA/UTL, Lisboa, 280 p. (2007).

FIGUEIREDO, E.; AMARO, F.; GODINHO, M.; STILWELL, S.; ALBANO, S.; SALVADO, E & MEXIA, A. Protecção Integrada em tomate de indústria: estimativa do risco de lagarta do tomate *Helicoverpa armigera*. 6º ENPI, *Painéis de Horticultura*: 557-564 (2003).

FIGUEIREDO, E.; AMARO, F.; GONÇALVES, C.; GODINHO, M.; SALVADO, EVA. & ALBANO, S. Lagarta do tomate *in* AMARO, F. & MEXIA, A. *Protecção integrada em tomate de indústria*. Projecto Pro Agro 189, Instituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas, 114 p. (2006).

FIGUEIREDO, E.; MUÑOZ D., MURILLO, R.; MEXIA, A. & CABALLERO, P. Diversity of Iberian nucleopolyhedrovirus wild-type isolates infecting *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), *Biological Control*, **50**: 43-49 (2009).

FRANKENHUYZEN, K. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*, **101**: 1-16 (2009).

FRESCATA, C. *Protecção contra pragas sem luta química*. Europa – América, Mem Martins, 169 p. (2004).

GARCIA, N. Biopesticide production from *Bacillus thuringiensis*: An Environmentally friendly alternative. *Recent patents on Biotechnolgy*, **3**: 28-36 (2009).

GHOSH, A.; CHATTERJEE, M. & ROY, A. Bio-efficacy of spinosad against tomato fruit borer (*Helicoverpa armigera* Hub.) (Lepidoptera: Noctuidae) and its natural enemies. *Journal of Horticulture and Forestry*, **2** (5): 108-111 (2010).

GILL, S. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* toxins. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **90** (1): 69-74 (1995).

GONÇALVES, C.; FIGUEIREDO, E.; ALBANO, S.; SALVADO, E.; QUEIRÓS, M.; GODINHO, M.; AMARO, F. & MEXIA, A. Limitação natural de lepidópteros por parasitóides oófagos em tomate de indústria. *Actas Portuguesas de Horticultura IV Congressos Iberoamericano de Culturas Hortícolas*, **3**: 82-87 (2005).

GUJAR, G. *Heliothis/Helicoverpa* resistance to *Bacillus thuringiensis* Management strategies *in* SHARMA, H. *Heliothis/Helicoverpa* Management Emerging Trends and Strategies for Future research. Science publishers Inc, USA, 469 p. (2005).

GUNNING, R. & BALFE, M. Spinosad resistance in Australian *Helicoverpa armigera* (Hbn) (Lepidoptera: Noctuidae). *Proceedings of 10th IUPAC International Congress on the chemistry of Crop Protection*, 290 p. (2002).

HALE, K. & PORTWOOD, D. The aerobic soil metabolism of spinosad – a novel natural insect control agent. *Journal of Environmental Sc. Health B31*: 431-477 (1996).

HARDWICK, D. The corn earworm complex. *Mem. Entomology Society, Canadá*, **40**: 246 p. (1965) (*Cit. in* Araújo, 1990).

INE - Instituto Nacional de Estatística. *Contas económicas da Agricultura 2011. 1ª estimativa*. Acedido a 17-12-2011 *in*: www.ine.pt (2011, 15 Dezembro).

IRAC - Insecticide Resistance Action Committee. *Lepidoptera Insecticide Mode of Action Classification: A key to effective insecticide resistance management*. Poster Ver. 3.4 Based on MoA Classification Ver. 7.1. Acedido a 02-11-2011 *in*: www.irac-online.org (2011, Julho).

JALALI, S.; MOHAN, K.; SINGH, S.; MANJUNATH, T. & LALITHA, Y. Baseline-susceptibility of the old-world bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Índia to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac insecticidal protein. *Crop Protection*, **23**: 53-59 (2004).

JAYARAJ, S. Biological and Ecological studies of *Heliothis armigera* in Icrisat, *Proc. Int. Workshop on Heliothis management*. India (1982). (Cit. in Araújo, 1990).

JURAT-FUENTES, J. Acedido a 01-12-2011 *in*: [http://web.utk.edu/~jurat/\(s/data\)](http://web.utk.edu/~jurat/(s/data)).

JURAT-FUENTES, J.; GOULD, F.; BLANCO, C.; PORTILLA, M.; PERERA, O. & ADANG, M. Reduced levels of membrane-bound alkaline phosphatase are common to Lepidopteran strains resistant to cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *PLoS ONE*, **6** (3): 1-8 (2011).

KAY, I. Evaluating new insecticides for the control of *Helicoverpa* spp. (Lepidoptera: Noctuidae) on capsicum and zucchini. *Australian Journal of Entomology*, **46**: 339-345 (2007).

KHAN, R. & JAMIL, F. Estimation of toxicity of spinosad using two different bioassay methods against cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hub.). *Pakistan Journal of Zoology*, **39** (2): 133-136 (2007).

KIRST, H. The spinosyn family of insecticides: realizing the potencial of natural products research. *The Journal of Antibiotics*, **63**: 101-111 (2010).

KOLLMAN, W. *Environmental fate of spinosad*. Department of pesticides regulation (DPR) of Sacramento/California, 16 p. (s/data).

KOPPERT. Acedido a 20-01-2012 *in*: [http://side-effects.koppert.nl/\(s/data\)](http://side-effects.koppert.nl/(s/data)).

KRANTHI, K.; ALI, S. & BANERJEE, S. Baseline toxicity of spinosad on the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hub.), in India. *Resistant Pest Management*, **11** (1): 9-12 (2000).

KRANTHI, K.; KRANTHI, S.; ALI, S. & BANERJEE, S. Resistance of Cry1Ac d-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in a laboratory selected strain of *Helicoverpa armigera* (Hubner). *Current Science*, **78** (8): 1001-1004 (2000) (cit. in Babu *et al.*, 2002).

KRANTHI, K.; KRANTHI, S. & WANJARI, R. Baseline toxicity of Cry1A toxins to *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: noctuidae) in India. *International Journal of Pest Management*, **47** (2): 141-145 (2010).

KROSCHEL J. Integrated Pest Management in Potato Production in the Republic of Yemen [with special reference to the integrated biological control of the potato tuber moth (*Phthorimaea operculella* Zeller)]. Margraf Verlag, Weikersheim, Germany (1995).

KROMP, B. *Evaluating inputs for organic farming – a new system. Case of study: spinosad*. Ludwig Boltzmann Institute for Biological Agriculture, 14 p. (s/data).

KUMAR, H. & KUMAR, V. Tomato expressing Cry1A(b) insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis* protected against tomato fruit borer, *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) damage in the laboratory, Greenhouse and field. *Crop Protection*, **21**: 135-139 (2004).

LAMMERS, J. & MACLEOD, A. *Report of a pest risk analysis: Helicoverpa armigera (Hbn)*. Plant Protection Service (NL) and Central Science laboratory (UK), 18 p. (2007).

LASCAS, J. Exportação Portugal: Tomate ribatejano abastece o Mundo. *Notícias Europa – Sul da Europa – Portugal*. Acedido a 17-12-2011 *in*: <http://export-hub.com/pt/noticias-europa/289-southern-europe-portugal/2481-exportacao-portugal-tomate-ribatejano-abastece-o-mundo> (2011, 15 Junho).

LAWO, N.; MAHON, R.; MILNER, R.; SARMAH, B.; HIGGINS, T. & ROMEIS, J. Effectiveness of *Bacillus thuringiensis*-Transgenic Chickpeas and the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* in Controlling *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Applied and Environmental Microbiology*, **74** (14): 4381-4389 (2008).

LI, H. & BOUWER, G. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry proteins to *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in South Africa. *Journal of Invertebrate Pathology*, **109**: 110-116 (2012).

LIAO, C.; HECKEL, D. & AKHURST, R. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins for *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae), major pests of cotton, *Journal of Invertebrate Pathology*, **80**: 55-66 (2002).

LIU, T.; SPARKS, A. & CHEN, W. Toxicity, persistence and efficacy of indoxacarb and two other insecticides on *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) immature in cabbage. *International Journal of Pest Management*, **49** (3): 235-241 (2010).

LIU, T.; SPARKS, A.; HENDRIX, W. & YUE, B. Effects of SpinTor (spinosad) on cabbage looper (Lepidoptera:Noctuidae): Toxicity and persistence of leaf residue on cabbage under field and Laboratory conditions. *Journal of Economic Entomology*, **92**: 1266-1273 (1999).

LUSOSEM. *Rótulo - Spintor*. Acedido a 01-08-2011 *in*:

[http://www.lusosem.pt/produtos_insecticida.html/A=8___collection=insecticida \(s/data\)](http://www.lusosem.pt/produtos_insecticida.html/A=8___collection=insecticida(s/data)).

MACHADO, V. & FIUZA, L. Evolução e manejo de resistência de insectos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, **38**: 68-74 (2010).

MADDURI, K.; WALDRON, C.; MATSUSHIMA, P.; BROUGHTON, M. CRAWFORD, K.; MERLO, D. & BALTZ, R. Genes for the biosynthesis of spinosyns: application for yield improvement in *Saccharopolyspora spinosa*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **27**: 399-402 (2001).

MANDAOKAR, A.; GOYAL, R.; SHUKLA, A.; BISARIA, S.; BHALLA, R.; REDDY, V. CHAURASIA, A.; SHARMA, R.; ALTOSAAR, I. & KUMAR, P. Transgenic tomato plants resistant to fruit borer (*Helicoverpa armigera* Hubner). *Crop Protection*, **19**: 307-312 (2000).

MARQUES, R. Utilização de *Bacillus thuringiensis* (Berl.) e de baculovirus no combate da *Helicoverpa armigera* (Hbn.) (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura do tomate para industria. Relatório do Trabalho de Fim de Curso de Eng. Agronómica. ISA/UTL, Lisboa, 133 p. (1997).

MARTINS, F. Curvas de voo e evolução do ataque da lagarta do tomate *Heliothis armigera* Hbn. *I Congresso Ibérico de Ciências Hortícolas*, **1**: 160-165 (1990a).

MARTINS, F. Grau de ataque de *Heliothis armigera* em tomate de indústria. *I Congresso Ibérico de Ciências Hortícolas*, **1**: 154-159 (1990b).

MEIERROSE, C. & ARAÚJO, J. Presença sazonal de alguns lepidópteros noctuídeos em campos de tomate no sul de Portugal. *Actas II Congresso Ibérico de Entomologia. Bolm. Sociedade Portuguesa de Entomologia*, **1**: 307-316 (1985).

MEIERROSE, C.; ARAÚJO, J. & FIGUEIREDO, D. Inimigos naturais de *Heliothis armigera* HBN. (Lepidoptera, Noctuidae) em campos de tomate, no Alentejo (Sul de Portugal). *Actas do II Congresso Ibérico de Entomologia*, **4**: 323-331 (1985).

MEIERROSE, C. & ARAÚJO, J. Natural egg parasitism in *Helicoverpa (Heliothis) armigera* Hbn. (Lepidoptera, Noctuidae) on tomato in south Portugal. *Journal of Applied Entomology*, **101**: 11-18 (1986).

MENSAH, R.; LIANG, W.; GIBB, D.; COATES, R. & JOHNSON, D. Improving the efficacy of nuclear polyhedrosis virus and *Bacillus thuringiensis* against *Helicoverpa* spp. with ultra-violet light protected petroleum spray oils on cotton crops in Australia. *International Journal of Pest Management*, **51** (2): 101-109 (2007).

MERTZ, F. & YAO, R. *Saccharopolyspora spinosa* sp. Nov. Isolated from Spol Collected in a Sugar Mill Rum Still. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **40** (1): 34-39 (1990).

MILLES, M. The effect of spinosad, a naturally derived insect control agente to the honeybee. *Bulletin of Insectology*, **56** (1): 119-124 (2003).

MUIR, P. A. *History of pesticide use*. Acedido a 24-02-2012 *in*: <http://people.oregonstate.edu/> (2007).

MURRAY, D.; LLOYD, R. & HOPKINSON, J. Efficacy of new insecticides for management of *Helicoverpa* spp. (Lepidoptera: Noctuidae) in Australian grain crops. *Australian Journal of Entomology*, **44**: 62-67 (2005).

NASREEN, A. & MUSTAFA, G. Biologiy of *Helicoverpa armigera* (Hbn) reared in laboratory on natural diet. *Pakistan Journal of Biological Science*, **3** (10): 1668-1669 (2000).

OMRI – Organic Materials Review Institute. *Spinosad – Crops*. National Organic Standards Board Technical Advisory Panel Review, 14 p. (2002).

NATROBA. Acedido a 01-12-2011 *in*: <http://www.natroba.com/health-care-professionals.html> (s/data).

OEPP – European and Mediterranean Plant Protection Organization. *PQR 5, Standart Program Database of quarantine pests*. Acedido a 23-11-2011 *in*: <http://www.eppo.int/DATABASES/pqr/pqr.htm> (atualização em 2008).

ORR, N., SHAFNNER, A., RICHEY, K. & CROUSE, G. Novel mode of action of spinosad: Receptor binding studies demonstrating lack of interaction with known insecticidal target sites. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **95**: 1-5 (2009).

PENG, D; XU, X.; YE, W.; YU, Z. & SUN, M. *Helicoverpa armigera* cadherin fragment enhances Cry1Ac insecticidal activity by facilitating toxin-oligomer formation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **85**: 1033-1040 (2010).

PINTO, L; BERLITZ, D.; CARTILHO-FORTES, R. & FIUZA, L. Toxinas de *Bacillus thuringiensis*. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, **38**: 24-31 (2010).

RAMASUBRAMANIAN, T. & REGYPATHY, A. Magnitude and mechanism of insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* Hub. population of Tamil Nadu, India. *Asian Journal of Plant Science*, **3** (1): 94-100 (2004).

SALGADO, V. Studies on the mode of action of spinosad: Insect Symptoms and Physiological correlates. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **60**: 91-102 (1998).

SALGADO, V. Studies on the mode of action of spinosad: The internal effective concentration and the concentration dependence of neural excitation. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **60**: 103-110 (1998).

SANCO. *Chlorpyrifos*, SANCO/3059/99 - rev. 1.5. Directorate E – Safety of the food chain, Unit E.3 - Chemicals, contaminants, pesticides. European commission Health & Consumer Protection Directorate-General, 70 p. (2005a).

SANCO. *Indoxacarb*, SANCO/1408/2001 – rev.3. Directorate E – Safety of the food chain, Unit E.3 - Chemicals, contaminants, pesticides. European commission Health & Consumer Protection Directorate-General, 45 p. (2005b).

SANCO. *Spinosad*, SANCO/1428/2001 – rev. Final. Directorate E – Safety of the food chain, Unit E.3 - Chemicals, contaminants, pesticides. European commission Health & Consumer Protection Directorate-General, 45 p. (2006).

SANCO. *Pesticides residues MRLs*. Acedido a 05-08-2012 **in**: http://ec.europa.eu/sanco_pesticides (2008a).

SANCO. *Bacillus thuringiensis ssp. aizawai, strain ABTS-1857*, SANCO/1539/08 – rev. 3. Directorate E – Safety of the food chain, Unit E.3 - Chemicals, contaminants, pesticides. European commission Health & Consumer Protection Directorate-General, 9 p. (2008b).

SANCO. *Bacillus thuringiensis ssp. aizawai*, strain GC-91, SANCO/1538/08 – rev.3. Directorate E – Safety of the food chain, Unit E.3 - Chemicals, contaminants, pesticides. European commission Health & Consumer Protection Directorate-General, 9 p. (2008c).

SANCO. *Bacillus thuringiensis ssp. tenebrionis*, strain NB 176 (TM 14-1), SANCO/1545/08 – rev. 3. Directorate E – Safety of the food chain, Unit E.3 - Chemicals, contaminants, pesticides. European commission Health & Consumer Protection Directorate-General, 10 p. (2008d).

SANCO. *Bacillus thuringiensis ssp. israelensis*, (Serotype H-14), strain AM65-52, SANCO/1540/08 – rev. 3. Directorate E – Safety of the food chain, Unit E.3 - Chemicals, contaminants, pesticides. European commission Health & Consumer Protection Directorate-General, 10 p. (2008e).

SANCO. *Bacillus thuringiensis ssp. kurstaki*, strain ABTS-351, SANCO/1541/08 – rev. 3. Directorate E – Safety of the food chain, Unit E.3 - Chemicals, contaminants, pesticides. European commission Health & Consumer Protection Directorate-General, 9 p. (2008f).

SANCO. *Bacillus thuringiensis ssp. kurstaki*, strain PB-54, SANCO/1542/08 – rev. 3. Directorate E – Safety of the food chain, Unit E.3 - Chemicals, contaminants, pesticides. European commission Health & Consumer Protection Directorate-General, 9 p. (2008g).

SANCO. *Bacillus thuringiensis ssp. kurstaki*, strains SA-11, SA-12 and EG2348, SANCO/1543/08 – rev. 3. Directorate E – Safety of the food chain, Unit E.3 - Chemicals, contaminants, pesticides. European commission Health & Consumer Protection Directorate-General, 9 p. (2008h).

SANTIS, E.; HERNÁNDEZ, L.; MARTÍNEZ, A.; CAMPOS, J.; FIGUEROA, J.; PHILIPPE, L.; CHAVARRIETA, J.; VIÑUELA, E.; SMAGGHE, G. & PINEDA, S. Long-term foliar persistence and efficacy of spinosad against beet armyworm under greenhouse conditions. *Pest Management Science*: 1-8 (2011).

SANTOSH, K. & SINGH, P. Role of alkaline phosphatase in insecticidal action of Cry1Ac against *Helicoverpa armigera* larvae. *Biotechnology Letters*, 1-10 (2011).

SAUNDERS, V. & BRET, B. Fate of spinosade in the environment. *Down to Earth*, **52** (1): 14-20 (1997).

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. & DEAN, D. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **62** (3): 775-806 (1998).

SPARKS, T.; CROUSE, G. & DURST, G. Natural products as insecticides: the biology, biochemistry and quantitative structure – activity relationships of spinosyns and spinosoids. *Pest Management Science*, **57**: 896-905 (2001).

SYNGENTA CROP PROTECTION. Acedido a 01-12-2011 *in*:

<http://www.syngenta.com/country/pt/pt/culturas/problemas/tomate/Pages/Lagartas.aspx> (s/data).

THOMPSON, G.; DUTTON, R. & SPARKS, T. Spinosad – A case study: an example from a natural products discovery programme. *Pest Management Science*, **56**: 696-702 (2000).

TOGUEBAYE & COUILLOUD, R. Étude descriptive de l'oeuf et des stade larvaires de *Heliothis armigera* (Hbn, 1908) (Lepidopeta, Noctuidae) en microscopie électronique à balayage, *Cot. Fib. Trop.*, **37** (2): 197-201 (1982) (*Cit. in* Araújo, 1990).

TOMLIN, CDS. The Pesticide Manual, Thirteenth Edition. British. Crop Protection Council, Alton, UK. (2003) (*cit. in* Kay, 2007).

UNSWORTH, J. *History of pesticide use*. IUPAC (International Union of pure and applied chemistry) Acedido a 24-02-12 *in*: <http://agrochemicals.iupac.org/> (2010, 10 Maio).

VALAITIS, A. Localization of *Bacillus Thuringiensis* Cry1A toxin-binding molecules in gypsy moth larval gut sections using fluorescence microscopy. *Journal of Invertebrate Pathology*, **108**: 69-75 (2011).

VOJOU, S.; SABER, M.; HEJAZI, M. & TALAEI-HASSANLOU, R. Toxicity of chlorpyrifos, spinosad and abamectin on cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* and their sublethal effects on fecundity and longevity. *Bulletin of Insectology*, **64** (2): 189-193 (2011).

WALDRON, C.; MADDURI, K.; CRAWFORD, K.; MERLO, D.; TREADWAY, P.; BROUGHTON, M & BALTZ, R. A cluster of genes for the biosynthesis of spinosyns, novel macrolide insect control agents produced by *Saccharopolyspora spinosa*. *Antonie van Leeuwenhoek*, **78**: 385-390 (2000).

WANG, D.; GONG, P.; LI, M.; QIU, X. & WANG, K. Sublethal effects of spinosad on survival, growth and reproduction of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Management Science*, **65**: 223-227 (2008).

WANG, D.; QIU, X.; REN, X.; NIU, F. & WANG, K. Resistance selection and biochemical characterization of spinosad resistance in *Helicoverpa armigera* (Hbn) (Lepidoptera: Noctuidae). *Pesticides Biochemistry and Physiology*, **95**: 90-94 (2009a).

WANG, D.; QIU, X.; REN, X.; ZHANG, W. & WANG, K. Effects of spinosad on *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from China: tolerance status, synergism and enzymatic responses. *Pest Management Science*, **65**: 1040-1046 (2009b).

WATSON, Actions of insecticidal spinosyns and γ -Aminobutyric Acid Responses from Small-Diameter Cockroach Neurons. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **71** (1): 20-28 (2001).

WILLIAMS, T.; VALLE, J. & VIÑUELA, E. Is the naturally derived insecticide Spinosad[®] compatible with insect natural enemies? *Biocontrol Science and Technology*, **13**: 459-475 (2003).

YANG, Y.; CHEN, H.; WU, S.W.; YANG, Y.H.; XU, J. & WU, Y. Identification and molecular detection of a deletion mutation responsible for a truncated cadherin of *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **36**: 735-740 (2006).

WU, K.; GUO, Y. & LU, N. Geographic variation in susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein in China. *Journal of Economic Entomology*, **92** (2): 273-278 (1999).

YANG, Y.; CHEN, H.; WU, Y.; YANG, Y. & WU, S. Mutated cadherin alleles from a field of *Helicoverpa armigera* confer resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac. *Applied and Environmental Microbiology*, **73** (21): 6939-6944 (2007).

Xu, X.; YU, L. & WU, Y. Disruption of a cadherin gene associated with resistance to Cry1Ac delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*. *Applied Environmental Microbiology*, **71**: 948-954 (2005).

ZHANG, S.; CHENG,H.; GAO, Y.; WANG, G.; LIANG, G. & WU, K. Mutation of an aminopeptidase N gene is associated with *Helicoverpa armigera* resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **39**: 421-429 (2009).

ZHAO, Z.; JIN, L.; YANG, Y. & WU, Y. Diverse cadherin mutations conferring resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **40**: 113-118 (2010).

ANEXOS

ANEXO I – Substâncias activas, autorizadas em Protecção Integrada, para lagartas na cultura do tomate.

Quadro 1 - Classificação toxicológica (Class. Tox.), formulação, frases de risco e de segurança e nomes comerciais das substâncias activas autorizadas em protecção integrada contra lagarta-do-tomate, em tomate (DGADR, 2011 e 2012).

Substância activa	Class. Tox. ⁽¹⁾	Formulação ⁽²⁾	Frases de risco e segurança ⁽³⁾	Marca Comercial
<i>B. thuringiensis</i>	Xn	SC	R65	DIPEL 8L
	Xi	WP	R36+R43	TUREX
	IS	WP	-	DIPEL WP, DIPEL, SEQURA
clorantianiliprol	Xi	WP	-	PRESA
	Xi	WP	R41	BELTHIRUL
	N	SC	R50/53	CORAGEN
clorpirifos	N	WG	R50/53	ALTACOR
	Xi, N	CS	R36+R43; R50/53	PYRINEX 250 ME
	Xn; N	EC	R10; R22+R65+R36/37/38+R67; R50/53	DURSBAN 4
	Xn; N	EC	R10; R20/22+R36/38+R43+R65; R50/53	CORTILAN
	Xn; N	EC	R20/22+R38+R65; R50/53; R55	CYREN 48EC
	Xn; N	EC	R10; R22+R38+R43; R50/53	CICLONE 48 EC
	Xn; N	EC	R10; R22+R38+R43; R50/53	RISBAN 48 EC
	Xn; N	EC	R20/22+R38+R65; R50/53	NUFOS 48 EC
	Xn; N	EC	R10; R22+R65+R36/37/38+R67; R50/53	CLORFOS 48
	Xn; N	EC	R10; R22+R65+R36/37/38+R67; R50/53	DESTROYER 480 EC
	Xn; N	EC	R10; R20/22+R36/38+R43+R65; R50/53	PIRIFOS 48
	N	MG	R51/53; R55	PYRINEX 5G
	N	MG	R51/53; R55	CYREN 5G
	N	MG	R51/53; R55	NUFOS 5GR
	N	MG	R51/53; R55	PIRIFOS 5G
	Xn; N	EC	R10; R20/22+R36/38+R43+R65; R50/53	PYRINEX 48 EC
	Xn; N	EC	R10; R20/22+R36/38+R43+R65; R50/53	CLORMAX
indoxacarbe	N	MG	R55; R50/53	CLORFOS 5G
	N	FG	R51/53; R55	CICLONE 5G
	N	FG	R51/53; R55	RIBSAN 5G
	Xn; N	WG	R22+R100; R51/R53	STEWART
	Xn; N	WG	R22+R100; R51/R53	EXPLICIT WG
lufenurão	C; N	EC	R01; R34+41+43+65+75; R51/53	MATCH 050 EC
	N	RB	R51/53	ADRESS
	Xi, N	EC	R43; R50/53	MATCH
spinosade	N	SC	R50/53	SPINTOR
	N	CB	R52/53	SPINTOR ISCO

(1): Is – Isento; Xi - Irritante; Xn - Nocivo; N – Perigoso para o ambiente;

(2) EC – Concentrado para emulsão; SC – Suspensão concentrada; WG – grânulos dispersíveis em água; WP – Pó molhável.

(3) Amaro, 2007.

Quadro 2 - Classificação toxicologica das substâncias activas autorizadas em Protecção Integrada (PI) para o combate de lagartas na cultura do tomate, relativamente aos auxiliares (Biobest, s/data; Koppert, s/data).

Auxiliares	Substancias activas(*)															
	<i>Bt</i> var. <i>kustaki</i>			clorpirifos			indoxacarbe			lufenurao			spinosade			
	T		P	T		P	T			P	T		P	T		P
	HVS	DUS		HVS	SPK		HVS	SPK	TMX		HVS	HVS		SPK		
<i>Amblyseius californicus</i>	(1) E, N, A		0	(3) N, A		2					(1) N, A		0	(1) N, A		0
<i>Amblyseius cucumeris</i>	(1) E, N, A	(1) A; (2) N	0	(4) N, E, A	(3) N, A	6-8; ?					(1) E, N, A		0	(4) A		1 a 2
<i>Amblyseius degenerans</i>	(1) E, N, A			(4) E, N, A		6 a 8					(1) N, A		0			
<i>Amblyseius swirskii</i>	(1) A		0				(3) A			?	(1) E, A		0	(4) E; A	(1) A	1 a 2; 0
<i>Aphelinus abdominalis</i>	(1) A		0													
<i>Aphidius colemani</i>	(1) M, A	(1) M	0	(4) M, A		?	(4) A			?	(1) M, A		0	(4) A		2
<i>Aphidius ervi</i>	(1) M, A	(1) M	0	(4) M, A		?					(1) M, A		0			
<i>Aphidius</i> spp.																
<i>Aphidoletes aphidimyza</i>	(1) L, A	(1) L	0	(4) A		?										
<i>Bombus</i> spp.	tapar		0	incompativel		?	remover			3	remover		2 a 3	Remover		1 a 2
<i>Chrysoperla carnea</i>	(1) L, A	(1) L	0	(4) L, A	(3) A	8-12; ?					(4) L, A		?	(1) L, P; (4) A		0
<i>Chrysoperla</i> spp.																
<i>Coccidoxenoides perminutus</i>	(1) A		0	(3) A		6										
<i>Coccinellidae</i>																
<i>Cryptolaemus montrouzieri</i>	(1) L, A	(1) L, A	0	(2) A		?										
<i>Coleoptera</i> spp.	(1) L, A			(3) L, A			(1) L, A				(4) L; (1) A			(1) L, A		
<i>Dacnusa sibirica</i>	(1) A		0	(4) A		?										
<i>Diglyphus isaea</i>	(1) A		0	(4) A	(3) A	?					(1) A		0			
<i>Encarsia formosa</i>	(1) P, A	(1) P; (2) A	0	(3) P; (4) A	(3) A	8-12; ?					(1) P; (4) A			(4) A		2
<i>Episyrphus balteatus</i>							(1) L			0						
<i>Eretmocerus eremicus</i>	(1) P, A	(1) P; (2) A			(3) A	?					(1) P, A		0			
<i>Eretmocerus mundus</i>														(4) A		?
<i>Feltiella acarisuga</i>	(1) L, A			(4) L, A			(1) L, A			0				(4) L		?
<i>Harmonia axyridis</i>	(1) A		0													
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	(1) L		0	(3) L		?										
<i>Heterorhabditis megidis</i>	(1) L		0	(3) L		?										
<i>Hypoaspis aculeifer</i>				(1) E; (2) N, A		0										
<i>Hypoaspis miles</i>				(1) E; (2) N, A		0										
<i>Leptomastix dactylopii</i>																
<i>Macrolophus caliginosus</i>	(1) N, A		0	(4) N		?		(4) A		2-3-	(4) N		4	(4) N	(4) N	2; 6
<i>Opius pallipes</i>	(1) A			(4) A		?								(4) A		?
<i>Opius</i> spp.											(4) N		41002			
<i>Orius insidiosus</i>	(1) N, A		0	(2) N; (4) A		5										
<i>Orius laevigatus</i>	(1) N, A		0	(2) N; (4) A		5	(3) A			>2				(4) N, A	(1) A	1 -2; 0
<i>Orius majusculus</i>	(1) N, A		0	(2) N; (4) A		5										
<i>Orius</i> spp.																
<i>Phytoseiulus persimilis</i>	(1) E, N, A	(1) E; (2) N	0	(1) E; (3) N, A		0	(1) A			?	(2) N, A		?	(2)^N, A		1
<i>Podisus maculiventris</i>	(1) N, A													(4) A		?
<i>Steinernema carpocapsae</i>				(4) L		1; ?										
<i>Steinernema feltiae</i>	(1) L	(1) L	0	(3) L		2; 0			(1) L	0	(2) N, A		?			0
<i>Streptomyces griseoviridis</i>	(1) B															
<i>Trichoderma harzianum</i>				(1) S		0										
<i>Trichogramma brassicae</i>	(1) P, A		0	(4) P, A		> 4					(2) A		?			
<i>Typhlodromus pyri</i>																
<i>Tricograma evanescens</i>	(1) L, A		0	(4) L, A		>4								(4) A		
<i>Verticillium lecanii-m</i>	(1) S	(1) S	0	(3) S		?										
<i>Verticillium lecanii-v</i>	(1) S	(1) S	0	(3) S		?										

Legenda: A - Adultos; B - Bactéria; E - Eggs; L- Larva; M - Mummy; N - ninpha; p- Pupa; P - Persistencia (em dias); S - Spore; DUS - dust; HVS - High volume spray; SPK - Sprinkle; TMX - Tankmix

T - Classificação toxicologica; (1) Harmfull (< 25% reduction); (2) Ligeiramente txico (25 - 50% redução); (3) Moderadamente tóxico (50 - 75% redução); (4) Muito tóxico (> 75% redução);

? - efeito/persistencia desconhecida;

(*) sem informação disponível para clorantraniliprol

ANEXO II – Dieta artificial para alimentação de *Helicoverpa armigera* criada em laboratório.

Ingredientes da dieta

- Ácido benzóico 1 g
- Ácido ascórbico (vitamina C) 4 g
- Nipagina 1 g
- Farinha de milho 125 g
- Gérmen de trigo 30 g
- Levedura de cerveja 30 g
- Agar 30 g
- H₂O 800 ml

Preparação

- 1º. Pesar os ingredientes no insectário;
- 2º. Por ao lume uma panela com 300 ml de água e deixar ferver;
- 3º. Quando começar a ferver juntar pouco a pouco o agar, não deixando que crie grumos e sim que fique uma mistura homogénea;
- 4ª Depois disto misturar o trigo, milho e levedura com o agar;
- 5º. Posteriormente ir juntando água (300 ml), pouco a pouco, como se fosse um bolo;
- 6º. Finalmente polvilhar com o ácido benzoico, ácido ascórbico e a nipagina (previamente diluída com etanol absoluto);
- 7º. Misturar mais 100 ml de água. Se necessário por até aos 800 ml de água recomendados na lista anterior.
- 8º. Deitar para um recipiente e deixar arrefecer e solidificar.
- 9º. Por fim conservar no frio ($\approx 5^{\circ}\text{C}$).

ANEXO III – Resultado dos ensaios de eficácia e persistência.

Quadro 3 - Observações dos ensaios de campo relativos aos estragos – Ensaio de eficácia.

Tratamento	Repetição	Total de frutos	Frutos com estragos de lagarta	Estragos (%)	Média	Desvio padrão
Testemunha	1	71	19	26,76	27,69	7,46
	2	63	17	26,98		
	3	57	15	26,32		
	4	29	7	24,14		
	5	31	13	41,94		
	6	45	9	20,00		
<i>B. thuringiensis</i>	1	71	13	18,31	15,80	2,05
	2	60	10	16,67		
	3	40	7	17,50		
	4	33	5	15,15		
	5	31	4	12,90		
	6	56	8	14,29		
spinosade	1	69	7	10,14	13,57	5,44
	2	73	14	19,18		
	3	38	8	21,05		
	4	16	2	12,50		
	5	26	3	11,54		
	6	43	3	6,98		

Quadro 4- Observações dos ensaios de campo relativos à mortalidade – Ensaio de eficácia.

Tratamento	Repetição	Total de larvas	Larvas mortas/desaparecidas	Mortalidade (%)	Média	Desvio padrão
Testemunha	1	24	18	75,00	72,92	5,74
	2	24	16	66,67		
	3	24	19	79,17		
	4	24	17	70,83		
	5	24	16	66,67		
	6	24	19	79,17		
<i>B. thuringiensis</i>	1	24	21	87,50	91,67	5,27
	2	24	20	83,33		
	3	24	22	91,67		
	4	24	23	95,83		
	5	24	23	95,83		
	6	24	23	95,83		
spinosade	1	24	22	91,67	97,92	3,49
	2	24	24	100,00		
	3	24	24	100,00		
	4	24	23	95,83		
	5	24	24	100,00		
	6	24	24	100,00		

Quadro 5 – Observações relativos ao 1º ensaio de persistência.

Dia	Tratamento	Repetição	Total de larvas usadas	Larvas mortas	Mortalidade (%)	Mortalidade Corrigida (%)	Média	Desvio Padrão	
1	Testemunha	1	4	1	25,00		6,25	2,06	
		2	4	0	0,00				
		3	4	0	0,00				
		4	4	0	0,00				
	<i>B. thuringiensis</i>	1	7	5	71,43	61,90	58,33		
		2	7	4	57,14	57,14			
		3	7	4	57,14	57,14			
		4	7	4	57,14	57,14			
	spinosade	1	7	7	100,00	100,00	85,71		17,50
		2	7	6	85,71	85,71			
		3	7	4	57,14	57,14			
		4	7	7	100,00	100,00			
2	Testemunha	1	4	1	25,00		12,50	14,29	
		2	4	0	0,00				
		3	4	0	0,00				
		4	4	1	25,00				
	<i>B. thuringiensis</i>	1	7	4	57,14	42,86	57,14		
		2	7	5	71,43	71,43			
		3	7	5	71,43	71,43			
		4	7	4	57,14	42,86			
	spinosade	1	7	7	100,00	100,00	100,00		0,00
		2	7	7	100,00	100,00			
		3	7	7	100,00	100,00			
		4	7	7	100,00	100,00			
3	Testemunha	1	4	1	25,00		6,25	2,06	
		2	4	0	0,00				
		3	4	0	0,00				
		4	4	0	0,00				
	<i>B. thuringiensis</i>	1	7	5	71,43	61,90	58,33		
		2	7	4	57,14	57,14			
		3	7	4	57,14	57,14			
		4	7	4	57,14	57,14			
	spinosade	1	7	6	85,71	80,95	91,67		8,50
		2	7	7	100,00	100,00			
		3	7	6	85,71	85,71			
		4	7	7	100,00	100,00			
4	Testemunha	1	2	0	0,00		0,00	27,24	
		2	2	0	0,00				
		3	2	0	0,00				
		4	2	0	0,00				
	<i>B. thuringiensis</i>	1	4	2	50,00	50,00	56,25		
		2	4	4	100,00	100,00			
		3	4	2	50,00	50,00			
		4	4	1	25,00	25,00			
	spinosade	1	4	4	100,00	100,00	100,00		0,00
		2	4	4	100,00	100,00			
		3	4	4	100,00	100,00			
		4	4	4	100,00	100,00			
5	Testemunha	1	1	0	0,00		0,00	27,64	
		2	1	0	0,00				
		3	1	0	0,00				
		4	1	0	0,00				
	<i>B. thuringiensis</i>	1	3	2	66,67	66,67	41,67		
		2	3	1	33,33	33,33			
		3	3	0	0,00	0,00			
		4	3	2	66,67	66,67			
	spinosade	1	3	3	100,00	100,00	91,67		14,43
		2	3	3	100,00	100,00			
		3	3	2	66,67	66,67			
		4	3	3	100,00	100,00			

Quadro 6 - Observações relativos ao 2º ensaio de persistência.

Dia	Tratamento	Repetição	Total de larvas usadas	Larvas mortas	Mortalidade (%)	Mortalidade Corrigida (%)	Média	Desvio padrão	
1	Testemunha	1	4	3	75,00		25,00	24,74	
		2	4	2	50,00				
		3	4	1	25,00				
		4	4	1	25,00				
	<i>B. thuringiensis</i>	1	7	4	57,14	42,86	66,67		
		2	7	4	57,14	42,86			
		3	7	7	100,00	100,00			
		4	7	6	85,71	80,95			
	spinosade	1	7	7	100,00	100,00	100,00		0,00
		2	7	7	100,00	100,00			
		3	7	7	100,00	100,00			
		4	7	7	100,00	100,00			
2	Testemunha	1	4	3	75,00		25,00	8,25	
		2	4	1	25,00				
		3	4	1	25,00				
		4	4	1	25,00				
	<i>B. thuringiensis</i>	1	7	6	85,71	80,95	76,19		
		2	7	5	71,43	61,90			
		3	7	6	85,71	80,95			
		4	7	6	85,71	80,95			
	spinosade	1	7	7	100,00	100,00	100,00		0,00
		2	7	7	100,00	100,00			
		3	7	7	100,00	100,00			
		4	7	7	100,00	100,00			
3	Testemunha	1	4	1	25,00		25,00	9,52	
		2	4	2	50,00				
		3	4	1	25,00				
		4	4	1	25,00				
	<i>B. thuringiensis</i>	1	7	7	100,00	100,00	90,48		
		2	7	6	85,71	80,95			
		3	7	6	85,71	80,95			
		4	7	7	100,00	100,00			
	spinosade	1	7	7	100,00	100,00	100,00		0,00
		2	7	7	100,00	100,00			
		3	7	7	100,00	100,00			
		4	7	7	100,00	100,00			
4	Testemunha	1	4	1	25,00		25,00	24,74	
		2	4	1	25,00				
		3	4	2	50,00				
		4	4	3	75,00				
	<i>B. thuringiensis</i>	1	7	7	100,00	100,00	100,00		
		2	7	7	100,00	100,00			
		3	7	7	100,00	100,00			
		4	7	7	100,00	100,00			
	spinosade	1	7	7	100,00	100,00	100,00		0,00
		2	7	7	100,00	100,00			
		3	7	7	100,00	100,00			
		4	7	7	100,00	100,00			

Quadro 6 - Observações relativos ao 2º ensaio de persistência (continuação).

Dia	Tratamento	Repetição	Total de larvas usadas	Larvas mortas	Mortalidade (%)	Mortalidade Corrigida (%)	Média	Desvio Padrão	
5	Testemunha	1	4	2	50,00		25,00	24,74	
		2	4	1	25,00				
		3	4	0	0,00				
		4	4	0	0,00				
	<i>B. thuringiensis</i>	1	7	4	57,14	42,86	66,67		
		2	7	7	100,00	100,00			
		3	7	6	85,71	80,95			
		4	7	4	57,14	42,86			
	spinosade	1	7	7	100,00	100,00	100,00		0,00
		2	7	7	100,00	100,00			
		3	7	7	100,00	100,00			
		4	7	7	100,00	100,00			
6	Testemunha	1	4	2	50,00		0,00	10,10	
		2	4	1	25,00				
		3	4	0	0,00				
		4	4	0	0,00				
	<i>B. thuringiensis</i>	1	7	3	42,86	42,86	42,86		
		2	7	4	57,14	57,14			
		3	7	3	42,86	42,86			
		4	7	2	28,57	28,57			
	spinosade	1	7	5	71,43	71,43	85,71		10,10
		2	7	6	85,71	85,71			
		3	7	7	100,00	100,00			
		4	7	6	85,71	85,71			
7	Testemunha	1	2	0	0,00		0,00	27,24312	
		2	2	0	0,00				
		3	2	1	50,00				
		4	2	0	0,00				
	<i>B. thuringiensis</i>	1	4	1	25,00	25,00	68,75		
		2	4	3	75,00	75,00			
		3	4	4	100,00	100,00			
		4	4	3	75,00	75,00			
	spinosade	1	4	3	75,00	75,00	93,75		10,82532
		2	4	4	100,00	100,00			
		3	4	4	100,00	100,00			
		4	4	4	100,00	100,00			

ANEXO IV – Resultados da análise estatística relativa aos ensaios de eficácia e persistência.

Quadro 7 - Posições calculadas para o teste de Friedman correspondentes aos estragos.

Tratamento	Ordem Média	N	Chi-quadrado	Graus de liberdade	Assimp. Sigma
Testemunha	1,00	6	11,565	2	0,003
<i>B. thuringiensis</i>	2,08				
spinosade	2,92				

Quadro 8 - Posições resultantes do teste de Friedman correspondentes à mortalidade.

Tratamento	Ordem Média	N	Chi-quadrado	Graus de liberdade	Assimp. Sigma
Testemunha	3,00	6	9,333	2	0,009
<i>B. thuringiensis</i>	1,67				
spinosade	1,33				

Quadro 9 - Posições resultantes do teste de Kruskal - Wallis relativos ao 1º ensaio de persistência.

Dia	Tratamento	N	Ordem média	Chi-quadrado	Graus de liberdade	Assimp. Sigma
1	Testemunha	4	2,50	9,021	2	0,011
	<i>B. thuringiensis</i>	4	7,13			
	spinosade	4	9,88			
2	Testemunha	4	2,50	10,353	2	0,006
	<i>B. thuringiensis</i>	4	6,50			
	spinosade	4	10,50			
3	Testemunha	4	2,50	10,203	2	0,006
	<i>B. thuringiensis</i>	4	6,50			
	spinosade	4	10,50			
4	Testemunha	4	2,50	9,835	2	0,007
	<i>B. thuringiensis</i>	4	7,00			
	spinosade	4	10,00			
5	Testemunha	4	3,00	8,996	2	0,011
	<i>B. thuringiensis</i>	4	6,25			
	spinosade	4	10,25			

Quadro 10 - Posições resultantes do teste de Kruskal - Wallis relativos ao 2º ensaio de persistência.

Dia	Tratamento	N	Ordem média	Chi-quadrado	Graus de liberdade	Assimp. Sigma
1	Testemunha	4	3,00	8,167	2	0,017
	<i>B. thuringiensis</i>	4	6,50			
	spinosade	4	10,00			
2	Testemunha	4	2,75	9,892	2	0,007
	<i>B. thuringiensis</i>	4	6,25			
	spinosade	4	10,50			
3	Testemunha	4	2,50	9,301	2	0,010
	<i>B. thuringiensis</i>	4	7,50			
	spinosade	4	9,50			
4	Testemunha	4	2,50	10,507	2	0,005
	<i>B. thuringiensis</i>	4	8,50			
	spinosade	4	8,50			
5	Testemunha	4	2,50	9,500	2	0,009
	<i>B. thuringiensis</i>	4	7,00			
	spinosade	4	10,00			
6	Testemunha	4	3,25	8,435	2	0,015
	<i>B. thuringiensis</i>	4	5,75			
	spinosade	4	10,50			
7	Testemunha	4	2,75	7,952	2	0,019
	<i>B. thuringiensis</i>	4	7,13			
	spinosade	4	9,63			

ANEXO V – Comparações múltiplas de medianas dos ensaios de eficácia e persistência.

Quadro 11 - Valores para cálculo de distâncias entre ordens, para os ensaios de eficácia (estragos e mortalidade).

alfa	p	Valor tabelado	Z	Distância mínima ⁽¹⁾	Distância mínima média ⁽²⁾
0,008333	0,05	0,491667	2,395	3,387041	0,564507

(1) Distância Mínima = $Z \times (\sqrt{R \times T \times (T + 1)})/N$, em que R é o número de repetições, T o número de tratamentos e N o número total de blocos.

(2) Distância mínima média = distancia mínima/N.

Quadro 12 - Comparações múltiplas de medianas relativas aos ensaios de eficácia.

Diferenças entre tratamentos	Estragos		Mortalidade	
	Resultados	Comparação ⁽³⁾	Resultados	Comparação ⁽³⁾
Testemunha - <i>B. thuringiensis</i>	1,33	x	1,08	x
Testemunha - spinosade	1,67	x	1,92	x
spinosade - <i>B. thuringiensis</i>	0,33	-	0,83	x

(3) Se a diferença entre a média entre Posições for superior à distância mínima média então existem diferenças significativas; Caso contrário não existem diferenças (Daniel, 1978). **Legenda:** x – existem diferenças; - - não existem diferenças

Quadro 13 - Valores para cálculo de distâncias entre ordens, para os ensaios de persistência.

alfa	p	Valor tabelado	Z	Distância mínima ⁽⁴⁾	Distância mínima média ⁽⁵⁾
0,008333	0,05	0,491667	2,395	3,786827	0,946707

(4) Distância mínima = $Z \times \sqrt{K(R + 1)}/N$, em que K é o número de tratamentos, R o número de repetições e N é o tamanho da amostra.

(5) Distância mínima média = Distância mínima/R, em que R é o número de repetições.

Quadro 14 – Diferenças entre tratamentos utilizados para comparações múltiplas - 1º ensaio de persistência.

Dia	Diferenças entre tratamentos	Resultados	Comparação ⁽⁶⁾
1	Testemunha - <i>B. thuringiensis</i>	4,63	x
	Testemunha - spinosade	7,38	x
	spinosade - <i>B. thuringiensis</i>	2,75	x
2	Testemunha - <i>B. thuringiensis</i>	4,00	x
	Testemunha - spinosade	8,00	x
	spinosade - <i>B. thuringiensis</i>	4,00	x
3	Testemunha - <i>B. thuringiensis</i>	4,00	x
	Testemunha - spinosade	8,00	x
	spinosade - <i>B. thuringiensis</i>	4,00	x
4	Testemunha - <i>B. thuringiensis</i>	4,50	x
	Testemunha - spinosade	3,00	x
	spinosade - <i>B. thuringiensis</i>	3,00	x
5	Testemunha - <i>B. thuringiensis</i>	3,25	x
	Testemunha - spinosade	7,25	x
	spinosade - <i>B. thuringiensis</i>	4,00	x

(6) Se a diferença entre a média entre Posições for superior à distância mínima média então existem diferenças significativas; caso contrário não existem diferenças (Daniel, 1978). **Legenda:** x – existem diferenças.

Quadro 15 – Diferenças entre tratamentos utilizados para comparações múltiplas - 2º ensaio de persistência.

Dia	Diferenças entre tratamentos	Resultados	Comparação ⁽⁷⁾
1	Testemunha - <i>B. thuringiensis</i>	3,50	x
	Testemunha - spinosade	7,00	x
	spinosade - <i>B. thuringiensis</i>	3,50	x
2	Testemunha - <i>B. thuringiensis</i>	3,50	x
	Testemunha - spinosade	7,75	x
	spinosade - <i>B. thuringiensis</i>	4,25	x
3	Testemunha - <i>B. thuringiensis</i>	5,00	x
	Testemunha - spinosade	7,00	x
	spinosade - <i>B. thuringiensis</i>	2,00	x
4	Testemunha - <i>B. thuringiensis</i>	6,00	x
	Testemunha - spinosade	6,00	x
	spinosade - <i>B. thuringiensis</i>	0,00	-
5	Testemunha - <i>B. thuringiensis</i>	4,50	x
	Testemunha - spinosade	7,50	x
	spinosade - <i>B. thuringiensis</i>	3,00	x
6	Testemunha - <i>B. thuringiensis</i>	2,50	x
	Testemunha - spinosade	7,25	x
	spinosade - <i>B. thuringiensis</i>	4,75	x
7	Testemunha - <i>B. thuringiensis</i>	4,38	x
	Testemunha - spinosade	6,88	x
	spinosade - <i>B. thuringiensis</i>	2,50	x

(7) Se a diferença entre a média entre Posições for superior à distância mínima média então existem diferenças significativas; caso contrário não existem diferenças (Daniel, 1978). **Legenda:** x – existem diferenças; - não existem diferenças.